

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 599**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/08** (2009.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2007** **E 14151431 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2722052**

54 Título: **Métodos para atenuar la liberación de mediadores inflamatorios y péptidos útiles en los mismos**

30 Prioridad:

**26.07.2006 US 833239 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.09.2019**

73 Titular/es:

**BIOMARCK PHARMACEUTICALS, LTD. (100.0%)  
2530 Meridian Parkway Ste. 300  
Durham NC 27713 , US**

72 Inventor/es:

**PARIKH, INDU**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 725 599 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para atenuar la liberación de mediadores inflamatorios y péptidos útiles en los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos para uso en el tratamiento de enfermedades y estados patológicos que implican inflamación. La presente invención también se refiere a estos péptidos para uso en la modulación de un mecanismo de señalización intracelular que regula la secreción de mediadores inflamatorios de células inflamatorias.

Antecedentes de la invención

10 Los leucocitos inflamatorios sintetizan una serie de mediadores inflamatorios que se aíslan intracelularmente y se almacenan en gránulos citoplásmicos unidos a la membrana. Ejemplos de tales mediadores incluyen, pero no se limitan a, mieloperoxidasa [MPO] en neutrófilos (véase, por ejemplo, Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89: 3503-3521), eosinófilo peroxidasa [EPO] y proteína básica principal [MBP] en eosinófilos (véase, por ejemplo, Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651-663), lisozima en monocitos/macrófagos (véase, por ejemplo, Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Struebe M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 173-182; y Balboa MA, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170: 5276-5280), y la granzima en las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos citotóxicos (véase, por ejemplo, Bochan MR, Goebel WS, Brahmi Z. Stably transfected antisense granzyme B and perforin constructs inhibit human granule-mediated lytic ability. *Cell Immunol* 1995; 164: 234-239; Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8: 652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 369-383; y Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104: 183-190). Dichos mediadores se liberan en sitios de lesión y contribuyen a la inflamación y reparación de tejidos, como en el pulmón y en otros lugares. Se sabe que los leucocitos liberan estos gránulos a través de un mecanismo exocítico (véase, por ejemplo, Burgoyne RD, Morgan A. Gránulos secretores de exocitosis. *Physiol Rev* 2003; 83: 581-632; y Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. (*J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 923-932), pero las moléculas reguladoras y las vías específicas involucradas en el proceso exocitótico no se han descrito completamente.

15 Diversos estímulos exógenos pueden provocar la desgranulación de los leucocitos a través de una vía que involucra la activación de la proteína quinasa C y los eventos subsiguientes de fosforilación (véase, por ejemplo, Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003; 83: 581-632; Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 923-932; Smolen JE, Sandborg RR. Ca<sup>2+</sup>-induced secretion by electropermeabilized human neutrophils: the roles of Ca<sup>2+</sup>, nucleotides and protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1052: 133-142; Niessen HW, Verhoeven AJ. Role of protein phosphorylation in the desgranulation of electropermeabilized human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1223: 267-273 y Naucler C, Grinstein S, Sundler R., Tapper H. Signaling to localized desgranulation in neutrophils adherent to immune complexes, *J Leukoc Biol* 2002; 71: 701-710).

20 La proteína MARCKS (donde MARCKS, como se usa en este documento, significa "Sustrato de quinasa C rico en alanina miristoilado"), es un objetivo de fosforilación ubicuo de la proteína quinasa C (PKC), y se expresa altamente en leucocitos (véase, por ejemplo, Aderem AA, Albert KA, Keum MM, Wang JK, Greengard P, Cohn ZA. Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for protein kinase C. *Nature* 1988; 332: 362-364; Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 1991; 351: 320-322; y Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 1992; 356: 618-622). La proteína MARCKS está involucrada mecánicamente en un proceso de secreción exocítica de mucina por parte de células caliciformes que recubren las vías respiratorias (véase, por ejemplo, Li et al., *J Biol Chem* 2001; 276: 40982-40990, and Singer et al., *Nat Med* 2004; 10: 193-196). MARCKS se miristoila mediante un enlace amida en el aminoácido N-terminal en la secuencia de aminoácidos de la proteína MARCKS en la posición alfa-amina de la glicina que reside en el término N (es decir, en la posición 1) de la secuencia de aminoácidos. En las células epiteliales de las vías respiratorias, la región N-terminal miristoilada de MARCKS parece ser parte integral del proceso secretor. Por el término N de la proteína MARCKS se entiende el péptido MANS que contiene miristoil-GAQFSKTAACKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1), que son L-aminoácidos. Además, los fragmentos peptídicos del péptido MANS descrito en el presente documento, también están compuestos preferiblemente de L-aminoácidos. El mecanismo parece implicar la unión de MARCKS, una proteína miristoilada, a membranas de gránulos intracelulares.

25 Se ha demostrado que un péptido miristoilado N-terminal del extremo N de MARCKS bloquea tanto la secreción de mucina como la unión de MARCKS a membranas de gránulos de mucina en células caliciformes (véase, por ejemplo, Singer et al., *Nat Med* 2004; 10: 193-196). Este péptido contiene 24 aminoácidos de la proteína MARCKS que comienzan con la glicina N-terminal de la proteína MARCKS que está miristoilada a través de un enlace amida y se conoce como secuencia alfa-N-terminal miristoilada (MANS); es decir, Miristoil-GAQFSKTAACKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1). También

5 Vergeres et al., J. Biochem. 1998, 330; 5-11, describe que el residuo de glicina N-terminal de las proteínas MARCKS está miristoilado mediante una reacción catalizada por miristoil CoA:proteína N-miristoil transferasa (NMT). En enfermedades inflamatorias, como asma, EPOC y bronquitis crónica; en enfermedades genéticas como la fibrosis quística; en condiciones alérgicas (atopia, inflamación alérgica); en la bronquiectasis; y en una serie de enfermedades respiratorias agudas e infecciosas, como neumonía, rinitis, influenza o resfriado común, artritis o enfermedades autoinmunes, las células inflamatorias generalmente se encuentran o migran a áreas de lesión o infección asociadas con estados de enfermedad inflamatoria, especialmente en las vías respiratorias o las vías respiratorias de pacientes que padecen tales enfermedades. Estas células inflamatorias pueden contribuir enormemente a la patología de las enfermedades a través del daño tisular producido por mediadores inflamatorios liberados de estas células. Un ejemplo de tal daño o destrucción tisular a través de esta inflamación crónica ocurre en pacientes con fibrosis quística en los que los mediadores liberados de los neutrófilos (por ejemplo, mieloperoxidasa [MPO]) inducen la descamación del tejido epitelial de las vías respiratorias.

15 MARCKS, una proteína de aproximadamente 82 kD, tiene tres regiones conservadas evolutivamente (Aderem et al., Nature 1988; 332: 362-364; Thelen et al., Nature 1991; 351: 320-322; Hartwig et al., Nature 1992; 356: 618-622; Seykora et al., J Biol Chem 1996; 271: 18797-18802): un extremo N, un dominio del sitio de fosforilación (o PSD) y un dominio de homología múltiple 2 (MH2). El ADNc de MARCKS humano y la proteína son conocidos y reportados por Harlan et al., J.Biol. Chem. 1991, 266: 14399 (número de acceso de GenBank M68956) y también por Sakai et al., Genomics 1992, 14: 175. Estas secuencias también se proporcionan en el documento WO 00/50062. El término N, una secuencia de alfa-aminoácidos que comprende 24 residuos de aminoácidos con una unidad estructural de ácido mirístico unido a través de un enlace amida al residuo de glicina N-terminal, está involucrado en la unión de MARCKS a membranas en células (Seykora et al., J Biol Chem 1996; 271: 18797-18802) y posiblemente a calmodulina (Matsubara et al., J Biol Chem 2003; 278: 48898-48902). Esta secuencia de 24 aminoácidos se conoce como el péptido MANS.

25 El documento WO2006/078899 describe el efecto del péptido acetilado-GAQFSKTAAK en un modelo en ratón de asma. También describe que otros fragmentos del péptido de la SEQ ID NO: 1 y su forma miristoilada reducen la secreción de mucina. El documento WO03/000027 describe el uso médico del péptido MANS en el tratamiento de la inflamación en enfermedades respiratorias, enfermedades intestinales, enfermedades de la piel, enfermedades autoinmunes o síndromes de dolor. También se describen los fragmentos activos del péptido MANS que comprenden al menos 6 aminoácidos.

#### Resumen de la invención

30 La participación de la proteína MARCKS en la liberación de mediadores inflamatorios de los gránulos de leucocitos infiltrantes es relevante para la inflamación en enfermedades de todos los tejidos y órganos, incluidas las enfermedades pulmonares caracterizadas por inflamación de las vías respiratorias, como el asma, la EPOC y la fibrosis quística. Sin embargo, la inflamación y la secreción de moco en las vías respiratorias son dos procesos separados e independientes (Li et al., J Biol Chem 2001; 276: 40982-40990; Singer et al., Nat Med 2004; 10: 193-196). Si bien la producción de moco y la secreción pueden ser provocadas por una serie de factores, incluidos los mediadores liberados por las células inflamatorias, no existe un vínculo directo conocido por el cual el exceso de moco cause inflamación.

El péptido MANS puede desempeñar un papel en la reducción de la velocidad y/o la cantidad de liberación de mediadores inflamatorios, gránulos o vesículas en leucocitos inflamatorios.

40 Péptidos derivados del término N de MARCKS, especialmente de la secuencia N-terminal de 24 aminoácidos, es decir, fragmentos peptídicos contiguos activos derivados de la secuencia de 1 a 24 aminoácidos N-terminal de MARCKS que tienen una glicina en la posición 1, así como amidas N-terminales de tales fragmentos, tales como amidas de ácido acético N-terminales de tales fragmentos, y/o así como amidas C-terminales de tales fragmentos, tales como amidas C-terminales de amoniaco, pueden inhibir o reducir la velocidad y/o la cantidad de liberación de mediadores inflamatorios de los leucocitos inflamatorios. Dicha inhibición o reducción en la liberación comprende la inhibición de una liberación relacionada con MARCKS de mediadores inflamatorios de los leucocitos inflamatorios.

45 Péptidos derivados del término N de MARCKS, especialmente de la secuencia N-terminal de 1 a 24 aminoácidos, es decir, fragmentos peptídicos contiguos activos derivados de la secuencia de 1 a 24 aminoácidos N-terminal de MARCKS que tienen una glicina en la posición 1, así como las amidas N-terminales de tales fragmentos tales como amidas del ácido acético N-terminales de tales fragmentos, y así como las amidas C-terminales de tales fragmentos tales como las amidas C-terminales de amoniaco, pueden inhibir la velocidad de liberación y/o cantidad de liberación de mediadores inflamatorios tales como los identificados en este documento en esta invención, mediante la inhibición del proceso de desgranulación en leucocitos inflamatorios.

55 El péptido MANS y sus fragmentos activos, y las amidas activas de los fragmentos descritos en el presente documento, pueden competir por la unión a la membrana en células inflamatorias con la proteína MARCKS nativa para atenuar (disminuir o reducir) la liberación relacionada con MARCKS de mediadores de la inflamación de gránulos o vesículas que contienen dichos mediadores de la inflamación en tales células inflamatorias.

Los tipos de células de leucocitos y los tipos de células modelo que secretan contenidos de gránulos específicos en respuesta a la activación de PKC inducida por el éster de forbol son útiles para la demostración in vitro de la eficacia de

los péptidos MANS de péptidos sustituidos (por ejemplo, alfa-N-amidas, C-amidas y ésteres terminales) para uso de acuerdo con esta invención.

La atenuación de la liberación de mediadores inflamatorios unidos a la membrana por los péptidos como se describe en el presente documento, incluidos los péptidos definidos en el primer aspecto, puede demostrarse utilizando líneas celulares de leucocitos humanos. Por ejemplo, los neutrófilos aislados de la sangre humana se pueden usar para demostrar la atenuación o inhibición de la liberación de mieloperoxidasa (MPO). El clon 15 de la línea celular promielocítica humana HL-60 se puede usar para demostrar la atenuación de la liberación o inhibición de la liberación o secreción de eosinófilo peroxidasa (EPO) por los péptidos (véase, por ejemplo, Fischkoff SA. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. *Leuk Res* 1988; 12: 679-686; Rosenberg HF, Ackerman SJ, Tenen DG. Human eosinophil cationic protein: molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. *Med* 1989; 170: 163-176; Tiffany HL, LiF, Rosenberg HF. Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 49-54; y Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil desgranulation and superoxide anion generation. *Exp Biol Med* 2002; 227: 645-651). La línea celular de leucemia monocítica U937 se puede usar para demostrar la atenuación de la liberación o inhibición de la liberación o secreción de lisozima por los péptidos (véase, por ejemplo, Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Strube M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170: 5276-5280 y Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-577). La línea celular NK-92 del asesino natural del linfocito se puede usar para demostrar la atenuación o inhibición de la liberación de granzima por los péptidos (véase, por ejemplo, Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8: 652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 369-383; y Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104: 183-190). En un método *in vitro* para inhibir o atenuar la liberación de un mediador de la inflamación como los descritos en el presente documento, cada uno de los tipos celulares se preincuba con un péptido en un rango de concentraciones seguido de la incubación de estas células por un estimulador de la liberación de mediadores inflamatorios, como el forbol éster. El porcentaje de inhibición de la liberación de un mediador de inflamación se determina en comparación con la liberación del mediador en ausencia del compuesto peptídico o composición peptídica, tal como en una lectura espectrofotométrica de una concentración del mediador liberado.

Para demostrar la importancia del posicionamiento de la secuencia de aminoácidos relativa en los péptidos descritos en el presente documento, incluidos los péptidos como se define en el primer aspecto, la capacidad relativa para inhibir o reducir la cantidad de mediador inflamatorio liberado por un péptido que es idéntico a la secuencia de 24 aminoácidos de la región N-terminal de la proteína MARCKS (es decir, el péptido de secuencia alfa-N-terminal miristilado MANS) se comparó con la capacidad de inhibir o reducir la cantidad de mediador inflamatorio liberado por un péptido que contiene los mismos 24 residuos de aminoácidos presentes en MANS pero que están secuenciadas en un orden aleatorio (es decir, un péptido RNS, también denominado "péptido de secuencia N-terminal aleatorio") con respecto al orden de secuencia en MANS. En cada uno de los tipos de células examinados, el péptido MANS, pero no el péptido RNS, atenuó la liberación de mediadores inflamatorios de una manera dependiente de la concentración durante un período de tiempo de 0.5 a 3.0 horas. Estos resultados sugieren que el posicionamiento relativo de la secuencia de aminoácidos en los péptidos que están en el orden encontrado en la proteína MARCKS, específicamente su región N-terminal, y más específicamente su región N-terminal del residuo de 24 aminoácidos está involucrado en al menos una vía intracelular que trata la inhibición de la desgranulación de los leucocitos.

En un primer aspecto, se proporciona un péptido para uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas que implican inflamación, en donde dicho péptido es un péptido acetilado N-terminal que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de una secuencia de referencia, SEQ ID NO: 1, o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y en donde la enfermedad es el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA) o lesión térmica de fase aguda.

En una realización, el péptido para uso de acuerdo con el primer aspecto se selecciona del grupo que consiste en: acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 106), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGE (SEQ ID NO: 11), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAE (SEQ ID NO: 37), acetil-AKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 45), acetil-GAQFSKTAAKGE (SEQ ID NO: 79), acetil-AAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 91), acetil-GAQQQQ (SEQ ID NO: 121), acetil-TAAKGEEA (SEQ ID NO: 143), acetil-RPGEAAVA (SEQ ID NO: 153), acetil-AKGE (SEQ ID NO: 219), acetil-GAQFSKTAAGE (SEQ ID NO: 239), acetil-GAQFSKTAAG (SEQ ID NO: 248), acetil-GAQFSKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 79), acetil-AQFSKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 93), acetil-QFSKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 108), acetil-FSKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 124), acetil-SKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 141) y acetil-AKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 219). En una realización, el péptido para uso de acuerdo con el primer aspecto está en una cantidad reductora de la liberación del mediador inflamatorio terapéuticamente eficaz y reduce la cantidad de al menos un mediador inflamatorio liberado de al menos una célula inflamatoria en comparación con la liberación de dicho mediador inflamatorio de al menos una del mismo tipo de célula inflamatoria que se produciría en ausencia de dicho péptido.

En una realización, la célula inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en un leucocito, un granulocito, un neutrófilo, un basófilo, un eosinófilo, un monocito, un macrófago y una combinación de los mismos.

5 En una realización, el al menos un mediador inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), eosinófilo peroxidasa (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima, histamina, proteoglicano, proteasa, un factor quimiotáctico, citoquina, un metabolito del ácido araquidónico, defensina, proteína que aumenta la permeabilidad bactericida (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, fosfolipasa A<sub>2</sub>, condroitina-4-sulfato, proteinasa 3, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, receptor del complemento, receptor N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP), receptor de laminina, citocromo b<sub>558</sub>, factor quimiotáctico de monocitos, histaminasa, vitamina B12 que se une a la proteína, gelatinasa, activador del plasminógeno, beta-D glucuronidasa, y una combinación de los mismos. Adecuadamente, el al menos un mediador inflamatorio es EPO. Adecuadamente, el al menos un mediador inflamatorio es MPO. Adecuadamente, el al menos un mediador inflamatorio es lisozima.

En una realización, el péptido para uso de acuerdo con el primer aspecto se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En una realización, la cantidad efectiva de reducción de la liberación del mediador inflamatorio de dicho péptido comprende una cantidad de péptido que inhibe la desgranulación que reduce la cantidad de al menos un mediador inflamatorio liberado de al menos una célula inflamatoria de entre 5 a 99% como en comparación con la cantidad liberada de al menos una célula inflamatoria en ausencia del péptido.

20 En una realización, el péptido para uso de acuerdo con el primer aspecto del péptido se administra por administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, administración nasal o administración oral. Adecuadamente, la administración pulmonar comprende aerosol.

En una realización, el aerosol se genera a partir de un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida o un nebulizador.

25 En una realización, el péptido para uso de acuerdo con el primer aspecto es para uso con una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un compuesto antiviral, un compuesto antiparasitario, un compuesto antiinflamatorio y un inmunomodulador.

30 En el presente documento también se describe un nuevo método para bloquear procesos secretores celulares relacionados con MARCKS, especialmente aquellos que implican la liberación relacionada con MARCKS de mediadores inflamatorios de células inflamatorias, cuyas vías de estimulación involucran la proteína MARCKS del sustrato de la proteína quinasa C (PKC) y la liberación de contenidos a partir de vesículas o gránulos intracelulares.

35 En el presente documento se describe también un método para inhibir la liberación exocitótica de al menos un mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria que comprende poner en contacto al menos una célula inflamatoria, célula que comprende al menos un mediador inflamatorio contenido dentro de una vesícula dentro de la célula, con al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido MANS y un fragmento activo del mismo en una cantidad efectiva para reducir la liberación del mediador inflamatorio de la célula inflamatoria en comparación con la liberación del mediador inflamatorio del mismo tipo de célula inflamatoria que ocurriría en ausencia de al menos un péptido.

40 En este documento se describe un método para inhibir la liberación de al menos un mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria en un tejido o fluido de un sujeto que comprende la administración al tejido y/o fluido del sujeto, que comprende al menos una célula inflamatoria que comprende a al menos un mediador inflamatorio contenido dentro de una vesícula dentro de la célula, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido MANS y un fragmento activo del mismo en una cantidad terapéuticamente efectiva para reducir la liberación de mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria en comparación con la liberación del mediador inflamatorio de al menos una del mismo tipo de célula inflamatoria que se produciría en ausencia de al menos un péptido. Más específicamente, la inhibición de la liberación de un mediador inflamatorio comprende bloquear o reducir la liberación de un mediador inflamatorio de la célula inflamatoria.

45 Más particularmente, en el presente documento se describe un método para reducir la inflamación en un sujeto que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido MANS (es decir, N-miristoil-GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1)) o un fragmento activo en esto. El fragmento activo tiene al menos cuatro y preferiblemente al menos seis aminoácidos de longitud.

50 Como se usa en este documento, un "fragmento activo" de una proteína MARCKS es uno que afecta (inhibe o reduce) la liberación mediada por la proteína MARCKS, como la liberación mediada por la proteína MARCKS de un mediador inflamatorio. Se puede seleccionar un fragmento activo del grupo que consiste en GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV (SEQ ID NO: 2); GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAA (SEQ ID NO: 4); GAQFSKTAAKGEAAAERPGEA (SEQ ID NO: 7); GAQFSKTAAKGEAAAERPGE (SEQ ID NO: 11); GAQFSKTAAKGEAAAERP (SEQ ID NO: 16); GAQFSKTAAKGEAAAERP (SEQ ID NO: 22); GAQFSKTAAKGEAAAER (SEQ ID NO: 29); GAQFSKTAAKGEAAA (SEQ ID NO: 37); GAQFSKTAAKGEAAA (SEQ ID NO: 46); GAQFSKTAAKGEAA (SEQ ID NO: 56); GAQFSKTAAKGEA (SEQ ID NO: 67); GAQFSKTAAKGE (SEQ ID NO: 79); GAQFSKTAAKG (SEQ ID NO: 92); GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 106);

GAQFSKTA (SEQ ID NO: 121); GAQFSKTA (SEQ ID NO: 137); GAQFSKT (SEQ ID NO: 154); GAQFSK (SEQ ID NO: 172); GAQFS (SEQ ID NO: 191) Y GAQF (SEQ ID NO: 211). Estos péptidos, en lugar de contener una unidad estructural miristoilo en el aminoácido N-terminal, no contienen una unidad estructural química o una unidad estructural química no miristoilo en el aminoácido N-terminal y/o una unidad estructural química en el aminoácido C-terminal, tal como un grupo acetilo N-terminal y/o un grupo amida C-terminal como se describe en el presente documento. La presencia de la unidad estructural miristoilo N-terminal hidrófobo en los péptidos MANS y sus fragmentos miristoilados N-terminales de los mismos puede mejorar su compatibilidad con y presumiblemente su permeabilidad a las membranas plasmáticas, y potencialmente permitir que los péptidos sean captados por las células. La inserción hidrófoba de un grupo miristoilo en una bicapa lipídica de membrana puede proporcionar un coeficiente de partición o una asociación aparente constante con lípidos de hasta  $10^4 \text{ M}^{-1}$  o una energía de unión libre de Gibbs unitaria de aproximadamente 8 kcal/mol (véase, por ejemplo, Peitzsch, R.M., and McLaughlin, S. 1993, Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32: 10436-10443) que es suficiente, al menos en parte, para permitir una división de los MANS y de los fragmentos de péptidos MANS miristoilados en la membrana plasmática de una célula, mientras que los grupos funcionales adicionales y sus interacciones dentro del péptido MANS (que está miristoilado) y dentro de los fragmentos de péptidos MANS miristoilados pueden potenciar sus permeabilidades de membrana relativas. Los fragmentos pueden mostrar cada uno coeficientes de partición y afinidades de membrana que son representativas de su estructura respectiva. Los fragmentos pueden prepararse por métodos de síntesis de péptidos conocidos en la técnica, como por ejemplo por síntesis de péptidos en fase sólida (véase, por ejemplo, los métodos descritos en Chan, Weng C. and White, Peter D. Eds., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, New York (2000) and Lloyd-Williams, P. et al. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins* (1997) y purificados por métodos conocidos en la técnica, tal como por cromatografía líquida de alta presión. El peso molecular de cada péptido se puede confirmar por espectroscopía de masas, mostrando cada uno un pico con una masa molecular apropiada. La eficacia de los péptidos individuales y de las combinaciones de péptidos individuales (por ejemplo, combinaciones de 2 de los péptidos, combinaciones de 3 de los péptidos, combinaciones de 4 de los péptidos) en los métodos de esta divulgación se puede determinar fácilmente sin experimentación indebida usando los procedimientos descritos en los ejemplos divulgados en este documento. Una combinación preferida comprenderá dos de los péptidos; una relación molar preferida de los péptidos puede ser de 50:50 (es decir, 1:1) a 99.99 a 0.01, relación que se puede determinar fácilmente usando los procedimientos descritos en los ejemplos descritos en este documento.

El péptido MANS o su fragmento activo puede estar contenido en una composición farmacéutica que es útil para bloquear la inflamación. En el presente documento también se describen métodos para inhibir un proceso de secreción celular en un sujeto que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un péptido MANS o un fragmento activo del mismo, que inhibe un mediador inflamatorio en un sujeto.

La administración de los péptidos descritos en este documento y los péptidos como se definen en el primer aspecto se selecciona generalmente del grupo que consiste en administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, inhalación y administración nasal u oral, en donde la administración pulmonar generalmente incluye ya sea un aerosol, un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida o un nebulizador.

La administración de una composición que comprende una cantidad inhibidora de desgranulación del péptido MANS o una cantidad inhibidora de desgranulación de un fragmento activo del mismo, tal como una composición farmacéutica del péptido MANS o un fragmento activo del mismo, para uso humano o animal proporciona el péptido MANS o su fragmento activo al menos en el sitio en o sobre un tejido o en una capa que contiene líquido en contacto con la superficie de un tejido donde reside una célula granulocítica inflamatoria o en la cual una célula granulocítica inflamatoria invadirá, permitiendo así el péptido MANS o un fragmento activo del mismo para entrar en contacto con la célula granulocítica inflamatoria. La administración de una composición de este tipo puede realizarse al inicio o la primera detección de la inflamación o la primera percepción de la inflamación por el humano o animal o al primer cambio perceptible en el nivel de inflamación en un ser humano o animal para reducir la cantidad de inflamación que de lo contrario se produciría en ausencia del péptido MANS o su fragmento activo. La administración puede realizarse durante una inflamación en curso de un tejido en el humano o animal para reducir la cantidad de inflamación adicional que de otro modo se produciría en ausencia del péptido MANS o su fragmento activo. Si bien la cantidad y la frecuencia de la dosis pueden determinarse por evaluación clínica y ser una función de la enfermedad o fuente de inflamación y la extensión del tejido involucrado y la edad y tamaño del paciente, se anticipa que la dosificación de una composición farmacéutica se puede repetir después de 3 a 8 horas, preferiblemente después de 6 a 8 horas después de la primera administración de la composición farmacéutica.

La presente invención se refiere a la reducción de la inflamación proporcionando péptidos como se define en el primer aspecto a un sujeto que inhibe la liberación de mediadores inflamatorios relacionada con MARCKS, por lo que la liberación de al menos un mediador inflamatorio en el sujeto se reduce en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicho tratamiento. Como se usa en este documento, "reducir" generalmente significa una disminución de los efectos de la inflamación. Preferiblemente, la liberación de mediadores inflamatorios se inhibe o bloquea mediante los métodos descritos.

En el presente documento se describen métodos para reducir la inflamación en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto (como un péptido como se describe en el primer aspecto) que inhibe la liberación de mediadores inflamatorios relacionada con MARCKS, por lo que la inflamación en el sujeto se reduce en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicho tratamiento. En el presente documento también se describen

métodos para reducir o inhibir la inflamación en un sujeto que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido MANS o un fragmento activo del mismo eficaz para inhibir un mediador inflamatorio en el sitio de la inflamación.

5 El término "inhibir" significa una reducción en la cantidad de secreción de mediador inflamatorio. El término "inhibir completamente" significa una reducción a cero en la cantidad de secreción de mediador inflamatorio. De nuevo, como se indicó anteriormente, el fragmento activo tiene al menos cuatro y preferiblemente al menos seis aminoácidos de longitud. El término "proceso exocitótico" significa exocitosis, es decir, un proceso de secreción o excreción celular en donde las sustancias contenidas en una vesícula, la vesícula que reside dentro de una célula, se descargan de la célula mediante la fusión de la membrana vesicular de la vesícula con el exterior. membrana celular. "Desgranulación" significa la liberación de contenidos de gránulos celulares. El término "inhibidor de la desgranulación" significa una reducción en la liberación de los mediadores inflamatorios contenidos dentro de los gránulos de la célula inflamatoria. Por lo tanto, una cantidad inhibidora de la desgranulación del péptido MANS y/o un fragmento activo del mismo es la cantidad de estos péptidos que es suficiente para reducir la liberación de los mediadores inflamatorios contenidos en los gránulos en comparación con la liberación en ausencia del mismo péptido.

15 En el péptido de referencia, GAQFSKTAACKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1), en la posición N-terminal del péptido de referencia, G está en la posición 1; adyacente a G en la posición 1 está A en la posición 2; adyacente a A en la posición 2 está Q en la posición 3; adyacente a Q en la posición 3 está F en la posición 4; adyacente a F en la posición 4 está S en la posición 5; adyacente a S en la posición 5 está K en la posición 6; adyacente a K en la posición 6 está T en la posición 7; adyacente a T en la posición 7 está A en la posición 8; adyacente a A en la posición 8 está A en la posición 9; adyacente a A en la posición 9 está K en la posición 10; adyacente a K en la posición 10 está G en la posición 11; adyacente a G en la posición 11 está E en la posición 12; adyacente a E en la posición 12 está A en la posición 13; adyacente a A en la posición 13 está A en la posición 14; adyacente a A en la posición 14 está A en la posición 15; adyacente a A en la posición 15 está E en la posición 16; adyacente a E en la posición 16 está R en la posición 17; adyacente a R en la posición 17 está P en la posición 18; adyacente a P en la posición 18 está G en la posición 19; adyacente a G en la posición 19 está E en la posición 20; adyacente a E en la posición 20 está A en la posición 21; adyacente a A en la posición 21 está A en la posición 22; adyacente a A en la posición 22 está V en la posición 23; y adyacente a V en la posición 23 está A en la posición 24, en donde la posición 24 es la posición C-terminal del péptido de referencia.

30 Una "variante" de un péptido de referencia o una variante de un segmento de 4 a 23 aminoácidos de un péptido de referencia es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia o de la secuencia de aminoácidos de el segmento del péptido de referencia, respectivamente, en al menos una posición de aminoácido en el péptido de referencia o la secuencia de aminoácidos del segmento de péptido de referencia, respectivamente, pero que retiene la actividad inhibidora de mucina o mucosidad, cuya actividad es típicamente entre 0.1 y 10 veces la actividad del péptido o segmento de referencia, respectivamente, preferiblemente entre 0.2 a 6 veces la actividad del péptido o segmento de referencia, respectivamente, más preferiblemente entre 0.3 a 5 veces la actividad del péptido o segmento de referencia, respectivamente. Una "variante" de una secuencia de aminoácidos de referencia o una variante de un segmento de 4 a 23 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de referencia es una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos de referencia o del segmento de la secuencia de aminoácidos de referencia, respectivamente, pero tiene una secuencia de aminoácidos de un péptido que retiene la actividad inhibidora de la mucina o mucosidad del péptido o segmento, respectivamente, codificada por la secuencia de aminoácidos de referencia, cuya actividad es típicamente entre 0.1 y 10 veces la actividad del péptido o segmento, respectivamente, de la secuencia de referencia, preferiblemente entre 0.2 y 6 veces la actividad del péptido o segmento de la secuencia de referencia, respectivamente, más preferiblemente entre 0.3 y 5 veces la actividad del péptido o segmento de la secuencia de referencia, respectivamente. Un péptido de variante de sustitución o una secuencia de aminoácidos de variante de sustitución pueden variar (es decir, diferir) de un péptido de referencia o secuencia de aminoácidos de referencia en una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de referencia; un péptido variante de eliminación o una secuencia de aminoácidos variante de eliminación puede variar (es decir, diferir) de un péptido de referencia o secuencia de aminoácidos de referencia en una o más eliminaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de referencia; y un péptido variante de adición o una secuencia de aminoácidos variante de adición puede variar (es decir, diferir) de una secuencia peptídica de referencia o secuencia de aminoácidos de referencia en una o más adiciones de aminoácidos en la secuencia de referencia. Una secuencia peptídica o variante de aminoácidos puede resultar de una sustitución de uno o más aminoácidos (por ejemplo, sustitución de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) en una secuencia de referencia, o puede resultar de una eliminación de uno o más aminoácidos (por ejemplo, eliminación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) en una secuencia de referencia, o puede resultar de una adición de uno o más aminoácidos (por ejemplo, la adición de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) en una secuencia de referencia, o una combinación de los mismos en cualquier orden. Una variante de sustitución de 4 a 23 segmentos peptídicos de aminoácidos o una variante de sustitución de 4 a 23 secuencias de segmentos de aminoácidos puede variar (es decir, diferir) de un segmento de referencia de 4 a 23 aminoácidos peptídicos o una referencia de 4 a 23 secuencias de segmentos de aminoácidos por uno o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de segmento de aminoácidos de referencia; una variante de eliminación de 4 a 23 segmentos peptídicos de aminoácidos o una secuencia de segmento de aminoácidos variante de eliminación de 4 a 22 aminoácidos puede variar (es decir, diferir) de un segmento de péptidos de referencia de 5 a 23 o una secuencia de segmentos de aminoácidos de referencia de 5 a 23 aminoácidos por una o más eliminaciones de aminoácidos en la secuencia del segmento de

aminoácidos de referencia; y un péptido variante de adición de 4 a 23 aminoácidos o una secuencia de aminoácidos variante de adición de 4 a 23 aminoácidos puede variar (es decir, diferir) de una secuencia de péptido de referencia de 4 a 22 aminoácidos o una secuencia de aminoácidos de referencia de 4 a 22 aminoácidos por una o más adiciones de aminoácidos en la secuencia de referencia. Un péptido variante de 4 a 23 aminoácidos o una secuencia de aminoácidos variante de 4 a 23 aminoácidos puede resultar de una sustitución de uno o más aminoácidos (por ejemplo, la sustitución de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 aminoácidos) en un segmento de 4 a 23 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de referencia, o puede resultar de una eliminación de uno o más aminoácidos (por ejemplo, eliminación de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos) en una secuencia de aminoácidos de referencia respectivamente más grande, o puede resultar de una adición de uno o más aminoácidos (por ejemplo, la adición de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 aminoácidos) en una secuencia de aminoácidos de referencia respectivamente más pequeña, o de una combinación de los mismos. Preferiblemente, una variante de péptido o secuencia de aminoácidos varía de un péptido de referencia o de un segmento de un péptido de referencia o de una secuencia de aminoácidos de referencia o de un segmento de una secuencia de aminoácidos de referencia, respectivamente, por menos de 10 sustituciones de aminoácidos, supresiones, y/o adiciones; más preferiblemente menos de 8 sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos; incluso más preferiblemente menos de 6 sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos; e incluso más preferiblemente menos de 5 sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos; y aún más preferiblemente menos de 4 sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos variante difiere de un péptido de referencia o secuencia de aminoácidos de segmento en uno o dos o tres aminoácidos.

"Identidad de secuencia" significa, con respecto a las secuencias de aminoácidos de dos péptidos, el número de posiciones con aminoácidos idénticos dividido por el número de aminoácidos en la más corta de las dos secuencias.

"Substancialmente idéntica" significa, con respecto a la comparación de las secuencias de aminoácidos de dos péptidos o la comparación de las secuencias de aminoácidos de dos segmentos de péptidos (por ejemplo, segmentos de una secuencia de aminoácidos peptídica de referencia), que la secuencia de aminoácidos de los péptidos o segmentos de péptidos tiene al menos 75% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia.

El término "péptido", como se usa en el presente documento, incluye el péptido, así como las sales farmacéuticamente aceptables del péptido.

Un péptido "aislado", como se usa en este documento, significa un péptido de origen natural que se ha separado o sustancialmente separado de los componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos y otros péptidos) que lo acompañan de forma natural, por purificación, síntesis recombinante o síntesis química, y también abarca péptidos sintetizados químicamente o de origen no natural que se han purificado o sustancialmente purificado a partir de componentes celulares, materiales biológicos, precursores químicos u otros productos químicos.

Las siguientes abreviaturas de aminoácidos de tres letras y de una letra se utilizan en todo el texto: Alanina: (Ala) A; Arginina: (Arg) R; Asparagina: (Asn) N; Ácido aspártico: (Asp) D; Cisteína: (Cys) C; Glutamina: (Gln) Q; ácido glutámico: (Glu) E; Glicina: (Gly) G; Histidina: (His) H; Isoleucina: (Ile) I; Leucina: (Leu) L; Lisina: (Lys) K; Metionina: (met) M; Fenilalanina: (Phe) F; Prolina: (Pro) P; Serina: (Ser) S; Treonina: (Thr) T; Triptófano: (Trp) W; Tirosina: (Tyr) Y; Valina: (Val) V. Los símbolos de tres letras adicionales de los aminoácidos útiles aquí incluyen, entre paréntesis, (Hyp) para la hidroxiprolina, (Nle) para la norleucina, (Orn) para la ornitina, (Pyr) para el ácido piroglutámico y (Sar) para sarcosina. Por convención, el extremo amino (o N-terminal) de un péptido aparece en el extremo izquierdo de una secuencia de aminoácidos escrita del péptido y el extremo carboxi (o C-terminal) aparece en el extremo derecho de una secuencia de aminoácidos escrita. La secuencia de aminoácidos de un péptido puede escribirse en símbolos de una sola letra para representar los aminoácidos que están unidos covalentemente por enlaces peptídicos de amida en el péptido.

Los fragmentos activos del péptido MANS pueden ser útiles en la prevención o reducción de la cantidad de inflamación en un tejido en un animal causado por mediadores inflamatorios. Los fragmentos activos del péptido MANS también pueden ser útiles en la prevención o reducción de la cantidad de daño tisular en un animal producido o causado por mediadores inflamatorios. Un fragmento activo del péptido MANS está compuesto de al menos 4 aminoácidos contiguos y no más de 23 aminoácidos contiguos del péptido MANS (SEQ ID NO: 1). El término "fragmento activo" en el contexto de la presente invención pretende abarcar aquellos fragmentos de los péptidos MANS que son capaces de prevenir o reducir la liberación de mediadores inflamatorios de una célula inflamatoria. La reducción de la liberación de mediadores inflamatorios por los fragmentos activos puede variar desde al menos un 5% a al menos un 99% de reducción en comparación con un péptido de referencia, tal como el péptido MANS.

La Tabla 1 contiene una lista de secuencias de aminoácidos en formato de abreviatura de una sola letra junto con un número de péptido correspondiente y la SEQ ID NO. La secuencia de aminoácidos del péptido de referencia (péptido MANS) se enumera como péptido 1. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos de la invención, que tienen una secuencia de aminoácidos de 4 a 23 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de referencia se enumeran como péptidos 2 a 231, junto con la secuencia de aminoácidos de una secuencia N-terminal aleatoria (RNS) que comprende aminoácidos del péptido MANS como péptido 232. Las secuencias de aminoácidos de variantes representativas de secuencias de aminoácidos de dichos péptidos también se enumeran como péptidos 233 a 245 y 247 a 251. Estos péptidos variantes enumerados no pretenden ser un grupo limitante de péptidos, pero se presentan solo para

servir como ejemplos representativos de péptidos variantes. También se presenta una secuencia de aminoácidos inversa representativa (péptido 246) y una secuencia de aminoácidos aleatoria representativa del péptido (péptido 232). Las secuencias de aminoácidos inversas y aleatorias en la tabla no pretenden ser representativas de la invención.

5 La Tabla 1 contiene una lista de péptidos, y sus respectivas secuencias de aminoácidos y las correspondientes SEQ ID NOS.

Tabla 1. Péptidos y secuencias de aminoácidos

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 1	GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 1
péptido 2	GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 2
péptido 3	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 3
péptido 4	GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 4
péptido 5	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 5
péptido 6	QFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 6
péptido 7	GAQFSKTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 7
péptido 8	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 8
péptido 9	QFSKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 9
péptido 10	FSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 10
péptido 11	GAQFSKTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 11
péptido 12	AQFSKTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 12
péptido 13	QFSKTAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 13
péptido 14	FSKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 14
péptido 15	SKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 15
péptido 16	GAQFSKTAAKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 16
péptido 17	AQFSKTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 17
péptido 18	QFSKTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 18
péptido 19	FSKTAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 19
péptido 20	SKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 20
péptido 21	KTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 21

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 22	GAQFSKTAAKGEEAAERP	SEQ ID NO. 22
péptido 23	AQFSKTAAKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 23
péptido 24	QFSKTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 24
péptido 25	FSKTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 25
péptido 26	SKTAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 26
péptido 27	KTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 27
péptido 28	TAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 28
péptido 29	GAQFSKTAAKGEEAAER	SEQ ID NO. 29
péptido 30	AQFSKTAAKGEEAAERP	SEQ ID NO. 30
péptido 31	QFSKTAAKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 31
péptido 32	FSKTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 32
péptido 33	SKTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 33
péptido 34	KTAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 34
péptido 35	TAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 35
péptido 36	AAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 36
péptido 37	GAQFSKTAAKGEEAAE	SEQ ID NO. 37
péptido 38	AQFSKTAAKGEEAAER	SEQ ID NO. 38
péptido 39	QFSKTAAKGEEAAERP	SEQ ID NO. 39
péptido 40	FSKTAAKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 40
péptido 41	SKTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 41
péptido 42	KTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 42
péptido 43	TAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 43
péptido 44	AAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 44
péptido 45	AKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 45
péptido 46	GAQFSKTAAKGEEAA	SEQ ID NO. 46

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 47	AQFSKTAAKGEAAAE	SEQ ID NO. 47
péptido 48	QFSKTAAKGEAAAER	SEQ ID NO. 48
péptido 49	FSKTAAKGEAAAERP	SEQ ID NO. 49
péptido 50	SKTAAKGEAAAERPG	SEQ ID NO. 50
péptido 51	KTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO. 51
péptido 52	TAAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO. 52
péptido 53	AAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 53
péptido 54	AKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 54
péptido 55	KGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 55
péptido 56	GAQFSKTAAKGEAA	SEQ ID NO. 56
péptido 57	AQFSKTAAKGEAAA	SEQ ID NO. 57
péptido 58	QFSKTAAKGEAAAE	SEQ ID NO. 58
péptido 59	FSKTAAKGEAAAER	SEQ ID NO. 59
péptido 60	SKTAAKGEAAAERP	SEQ ID NO. 60
péptido 61	KTAAKGEAAAERPG	SEQ ID NO. 61
péptido 62	TAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO. 62
péptido 63	AAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO. 63
péptido 64	AKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 64
péptido 65	KGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 65
péptido 66	GEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 66
péptido 67	GAQFSKTAAKGEA	SEQ ID NO. 67
péptido 68	AQFSKTAAKGEAA	SEQ ID NO. 68
péptido 69	QFSKTAAKGEAAA	SEQ ID NO. 69
péptido 70	FSKTAAKGEAAAE	SEQ ID NO. 70
péptido 71	SKTAAKGEAAAER	SEQ ID NO. 71

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 72	KTAAKGEEAAERP	SEQ ID NO. 72
péptido 73	TAAKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 73
péptido 74	AAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 74
péptido 75	AKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 75
péptido 76	KGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 76
péptido 77	GEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 77
péptido 78	EAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 78
péptido 79	GAQFSKTAAKGE	SEQ ID NO. 79
péptido 80	AQFSKTAAKGEA	SEQ ID NO. 80
péptido 81	QFSKTAAKGEAA	SEQ ID NO. 81
péptido 82	FSKTAAKGEEAAA	SEQ ID NO. 82
péptido 83	SKTAAKGEEAAE	SEQ ID NO. 83
péptido 84	KTAAKGEEAAER	SEQ ID NO. 84
péptido 85	TAAKGEEAAERP	SEQ ID NO. 85
péptido 86	AAKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 86
péptido 87	AKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 87
péptido 88	KGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 88
péptido 89	GEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 89
péptido 90	EAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 90
péptido 91	AAERPGEAA VA	SEQ ID NO. 91
péptido 92	GAQFSKTAAKG	SEQ ID NO. 92
péptido 93	AQFSKTAAKGE	SEQ ID NO. 93
péptido 94	QFSKTAAKGEA	SEQ ID NO. 94
péptido 95	FSKTAAKGEAA	SEQ ID NO. 95
péptido 96	SKTAAKGEEAAA	SEQ ID NO. 96

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 97	KTAAKGEEAAE	SEQ ID NO. 97
péptido 98	TAAKGEEAAER	SEQ ID NO. 98
péptido 99	AAKGEEAAERP	SEQ ID NO. 99
péptido 100	AKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 100
péptido 101	KGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 101
péptido 102	GEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 102
péptido 103	EAAERPGEAA	SEQ ID NO. 103
péptido 104	AAERPGEAAV	SEQ ID NO. 104
péptido 105	AAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 105
péptido 106	GAQFSKTAAK	SEQ ID NO. 106
péptido 107	AQFSKTAAKG	SEQ ID NO. 107
péptido 108	QFSKTAAKGE	SEQ ID NO. 108
péptido 109	FSKTAAKGEA	SEQ ID NO. 109
péptido 110	SKTAAKGEAA	SEQ ID NO. 110
péptido 111	KTAAKGEEAAA	SEQ ID NO. 111
péptido 112	TAAKGEEAAE	SEQ ID NO. 112
péptido 113	AAKGEEAAER	SEQ ID NO. 113
péptido 114	AKGEEAAERP	SEQ ID NO. 114
péptido 115	KGEEAAERPG	SEQ ID NO. 115
péptido 116	GEEAAERPGE	SEQ ID NO. 116
péptido 117	EAAERPGEA	SEQ ID NO. 117
péptido 118	AAERPGEAA	SEQ ID NO. 118
péptido 119	AAERPGEAAV	SEQ ID NO. 119
péptido 120	AERPGEAAVA	SEQ ID NO. 120
péptido 121	GAQFSKTAA	SEQ ID NO. 121

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 122	AQFSKTAAK	SEQ ID NO. 122
péptido 123	QFSKTAAKG	SEQ ID NO. 123
péptido 124	FSKTAAKGE	SEQ ID NO. 124
péptido 125	SKTAAKGEEA	SEQ ID NO. 125
péptido 126	KTAAKGEEA	SEQ ID NO. 126
péptido 127	TAAKGEEAA	SEQ ID NO. 127
péptido 128	AAKGEEAAE	SEQ ID NO. 128
péptido 129	AKGEEAAER	SEQ ID NO. 129
péptido 130	KGEEAAERP	SEQ ID NO. 130
péptido 131	GEEAAERPG	SEQ ID NO. 131
péptido 132	EAAERPGEE	SEQ ID NO. 132
péptido 133	AAERPGEEA	SEQ ID NO. 133
péptido 134	AAERPGEEA	SEQ ID NO. 134
péptido 135	AERPGEEAV	SEQ ID NO. 135
péptido 136	ERPGEEAVA	SEQ ID NO. 136
péptido 137	GAQFSKTA	SEQ ID NO. 137
péptido 138	AQFSKTAA	SEQ ID NO. 138
péptido 139	QFSKTAAK	SEQ ID NO. 139
péptido 140	FSKTAAKG	SEQ ID NO. 140
péptido 141	SKTAAKGE	SEQ ID NO. 141
péptido 142	KTAAKGEEA	SEQ ID NO. 142
péptido 143	TAAKGEEA	SEQ ID NO. 143
péptido 144	AAKGEEAA	SEQ ID NO. 144
péptido 145	AKGEEAAE	SEQ ID NO. 145
péptido 146	KGEEAAER	SEQ ID NO. 146

## ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 147	GEAAAERP	SEQ ID NO. 147
péptido 148	EAAAERPG	SEQ ID NO. 148
péptido 149	AAAERPGE	SEQ ID NO. 149
péptido 150	AAERPGEA	SEQ ID NO. 150
péptido 151	AERPGEAA	SEQ ID NO. 151
péptido 152	ERPGEAAV	SEQ ID NO. 152
péptido 153	RPGEAAVA	SEQ ID NO. 153
péptido 154	GAQFSKT	SEQ ID NO. 154
péptido 155	AQFSKTA	SEQ ID NO. 155
péptido 156	QFSKTAA	SEQ ID NO. 156
péptido 157	FSKTAAK	SEQ ID NO. 157
péptido 158	SKTAAKG	SEQ ID NO. 158
péptido 159	KTAAKGE	SEQ ID NO. 159
péptido 160	TAAKGEA	SEQ ID NO. 160
péptido 161	AAKGEEA	SEQ ID NO. 161
péptido 162	AKGEEAA	SEQ ID NO. 162
péptido 163	KGEEAAE	SEQ ID NO. 163
péptido 164	GEAAAER	SEQ ID NO. 164
péptido 165	EAAAERP	SEQ ID NO. 165
péptido 166	AAAERPG	SEQ ID NO. 166
péptido 167	AAERPGE	SEQ ID NO. 167
péptido 168	AERPGEA	SEQ ID NO. 168
péptido 169	ERPGEAA	SEQ ID NO. 169
péptido 170	RPGEAAV	SEQ ID NO. 170
péptido 171	PGEEAAVA	SEQ ID NO. 171

## ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 172	GAQFSK	SEQ ID NO. 172
péptido 173	AQFSKT	SEQ ID NO. 173
péptido 174	QFSKTA	SEQ ID NO. 174
péptido 175	FSKTAA	SEQ ID NO. 175
péptido 176	SKTAAK	SEQ ID NO. 176
péptido 177	KTAAKG	SEQ ID NO. 177
péptido 178	TAAKGE	SEQ ID NO. 178
péptido 179	AAKGEA	SEQ ID NO. 179
péptido 180	AKGEAA	SEQ ID NO. 180
péptido 181	KGEEAA	SEQ ID NO. 181
péptido 182	GEAAAE	SEQ ID NO. 182
péptido 183	EAAAER	SEQ ID NO. 183
péptido 184	AAAERP	SEQ ID NO. 184
péptido 185	AAERPG	SEQ ID NO. 185
péptido 186	AERPGE	SEQ ID NO. 186
péptido 187	ERPGEA	SEQ ID NO. 187
péptido 188	RPGEAA	SEQ ID NO. 188
péptido 189	PGEAAV	SEQ ID NO. 189
péptido 190	GEAAVA	SEQ ID NO. 190
péptido 191	GAQFS	SEQ ID NO. 191
péptido 192	AQFSK	SEQ ID NO. 192
péptido 193	QFSKT	SEQ ID NO. 193
péptido 194	FSKTA	SEQ ID NO. 194
péptido 195	SKTAA	SEQ ID NO. 195
péptido 196	KTAAK	SEQ ID NO. 196

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 197	TAAKG	SEQ ID NO. 197
péptido 198	AAKGE	SEQ ID NO. 198
péptido 199	AKGEA	SEQ ID NO. 199
péptido 200	KGEAA	SEQ ID NO. 200
péptido 201	GEAAA	SEQ ID NO. 201
péptido 202	EAAAE	SEQ ID NO. 202
péptido 203	AAAER	SEQ ID NO. 203
péptido 204	AAERP	SEQ ID NO. 204
péptido 205	AERPG	SEQ ID NO. 205
péptido 206	ERPGE	SEQ ID NO. 206
péptido 207	RPGEA	SEQ ID NO. 207
péptido 208	PGEAA	SEQ ID NO. 208
péptido 209	GEAAV	SEQ ID NO. 209
péptido 210	EAAVA	SEQ ID NO. 210
péptido 211	GAQF	SEQ ID NO. 211
péptido 212	AQFS	SEQ ID NO. 212
péptido 213	QFSK	SEQ ID NO. 213
péptido 214	FSKT	SEQ ID NO. 214
péptido 215	SKTA	SEQ ID NO. 215
péptido 216	KTAA	SEQ ID NO. 216
péptido 217	TAAK	SEQ ID NO. 217
péptido 218	AAKG	SEQ ID NO. 218
péptido 219	AKGE	SEQ ID NO. 219
péptido 220	KGEA	SEQ ID NO. 220
péptido 221	GEAA	SEQ ID NO. 221

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 222	EAAA	SEQ ID NO. 222
péptido 223	AAAE	SEQ ID NO. 223
péptido 224	AAER	SEQ ID NO. 224
péptido 225	AERP	SEQ ID NO. 225
péptido 226	ERPG	SEQ ID NO. 226
péptido 227	RPGE	SEQ ID NO. 227
péptido 228	PGEA	SEQ ID NO. 228
péptido 229	GEAA	SEQ ID NO. 229
péptido 230	EAAV	SEQ ID NO. 230
péptido 231	AAVA	SEQ ID NO. 231
péptido 232	GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF	SEQ ID NO. 232
péptido 233	GKQFSKTAAKGE	SEQ ID NO. 233
péptido 234	GAQFSKTKAKGE	SEQ ID NO. 234
péptido 235	GKQFSKTKAKGE	SEQ ID NO. 235
péptido 236	GAQASKTAAK	SEQ ID NO. 236
péptido 237	GAQASKTAAKGE	SEQ ID NO. 237
péptido 238	GAEFSKTAAKGE	SEQ ID NO. 238
péptido 239	GAQFSKTAAGE	SEQ ID NO. 239
péptido 240	GAQFSKTAAKAE	SEQ ID NO. 240
péptido 241	GAQFSKTAAKGA	SEQ ID NO. 241
péptido 242	AAQFSKTAAK	SEQ ID NO. 242
péptido 243	GAAFSKTAAK	SEQ ID NO. 243
péptido 244	GAQFAKTAAK	SEQ ID NO. 244
péptido 245	GAQFSATAAK	SEQ ID NO. 245
péptido 246	KAATKSFQAG	SEQ ID NO. 246

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 247	GAQFSKAAAK	SEQ ID NO. 247
péptido 248	GAQFSKATAA	SEQ ID NO. 248
péptido 249	GAQFSATAAA	SEQ ID NO. 249
péptido 250	GAQASKTA	SEQ ID NO. 250
péptido 251	AAGE	SEQ ID NO. 251
péptido 252	GKASQFAKTA	SEQ ID NO. 252

Una secuencia de aminoácidos de un péptido enumerado en la Tabla 1 puede modificarse químicamente. Por ejemplo, si una secuencia de aminoácidos de un péptido enumerado en la Tabla 1 se modifica químicamente en la amina N-terminal para formar una amida con un ácido carboxílico, el péptido resultante a veces se menciona aquí por una combinación de un identificador para el carboxílico ácido como un prefijo vinculado por un guion al número de péptido. Por ejemplo, con respecto al péptido 79 como ejemplo, a veces se puede hacer referencia a un péptido miristoilado N-terminal 79 aquí como "péptido miristoilado 79" o "péptido myr 79"; un péptido 79 acetilado N-terminal a veces se puede denominar en el presente documento como "acetil-péptido 79" o "Ac-péptido 79". Una versión cíclica del péptido 79 puede denominarse "péptido cíclico 79" o "péptido cyc 79". Además, por ejemplo, si una secuencia de aminoácidos de un péptido listado en la Tabla 1 se modifica químicamente en el grupo carboxílico C-terminal, por ejemplo, por una amina como el amoniaco para formar una amida C-terminal, el péptido resultante a veces se refiere en el presente documento mediante una combinación de un identificador para el residuo de amina como un sufijo unido por un guion al número de péptido. Así, por ejemplo, una amida C-terminal del péptido 79 puede denominarse a veces "péptido-NH2". Cuando la amina N-terminal del péptido (por ejemplo, el péptido 79) se modifica químicamente mediante, por ejemplo, un grupo miristoilo y el grupo carboxílico C-terminal se modifica químicamente mediante, por ejemplo, un grupo amoniaco para formar una amida como la anterior, el péptido resultante se puede referir a veces, usando la notación de prefijo y sufijo, como "myr-péptido 79-NH2". La invención involucra péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que comprenden menos de 24 aminoácidos con secuencias de aminoácidos relacionadas con la secuencia de aminoácidos del péptido MANS (es decir, el péptido MANS es el péptido miristoil 1 y la secuencia de 24 aminoácidos de referencia del péptido MANS es el péptido 1), como se define en el primer aspecto. Dichos péptidos consisten en secuencias de aminoácidos que contienen menos de 24 aminoácidos, y pueden consistir de 8 a 14, de 10 a 12, de 9 a 14, de 9 a 13, de 10 a 13, de 10 a 14, al menos 9, al menos 10, o aminoácidos similares. Los péptidos son típicamente cadenas lineales, pero también pueden ser péptidos cíclicos. Además, los péptidos pueden ser péptidos aislados.

Con respecto al péptido 1 (SEQ ID NO: 1), la secuencia de aminoácidos de referencia 24, un segmento de 23 aminoácidos continuos de la secuencia de aminoácidos de referencia a veces se denomina en este documento como 23-mero. Análogamente, un segmento de 22 aminoácidos continuos de la secuencia de referencia a veces se denomina aquí como un 22-mero; una secuencia de 21 aminoácidos como 21-mero; una secuencia de 20 aminoácidos como 20-mero; una secuencia de 19 aminoácidos como un 19-mero; una secuencia de 18 aminoácidos como un 18-mero; una secuencia de 17 aminoácidos como 17-mero; una secuencia de 16 aminoácidos como 16-mero; una secuencia de 15 aminoácidos como 15-mero; una secuencia de 14 aminoácidos como 14-mero; una secuencia de 13 aminoácidos como un 13-mero; una secuencia de 12 aminoácidos como 12-mero; una secuencia de 11 aminoácidos como un 11-mero; una secuencia de 10 aminoácidos como un 10-mero; una secuencia de 9 aminoácidos como 9-mero; una secuencia de 8 aminoácidos como un 8-mero; una secuencia de 7 aminoácidos como un 7-mero; una secuencia de 6 aminoácidos como un 6-mero; una secuencia de 5 aminoácidos como un 5-mero; y una secuencia de 4 aminoácidos como un 4-mero. Cualquiera de estas secuencias de aminoácidos "4 a 23-mero", que son en sí mismas péptidos (algunas veces denotadas aquí como H2N-péptido-COOH), pueden modificarse químicamente de manera independiente, por ejemplo, mediante modificación química, modificación química que puede seleccionarse del grupo que consiste en (i) formación de amida en el grupo amina N-terminal (H2N-péptido-) tal como, por ejemplo, con un C1 o preferiblemente con un C2 (ácido acético) a ácido carboxílico C22; (ii) formación de amida en el grupo carboxílico C-terminal (-péptido-COOH) tal como, por ejemplo, con amoniaco o con una amina primaria o secundaria de C1 a C22; y (iii) una combinación de los mismos.

Los péptidos tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia, el péptido 1; (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), variante que se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de eliminación, una variante de adición, y combinaciones de las mismas. En alguna realización, los péptidos tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 8 a 14 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia, péptido 1; (b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente

idéntica a la secuencia definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), variante que se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de eliminación, una variante de adición y sus combinaciones. En otras realizaciones más, los péptidos tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 10 a 12 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia, péptido 1; (b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), variante que se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de eliminación, una variante de adición y combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, los péptidos tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 9, al menos 10, de 9 a 14, de 9 a 13, de 10 a 13, de 10 a 14, o aminoácidos contiguos similares de la secuencia de referencia, péptido 1; una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma; o una variante de la misma, variante que se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de eliminación, una variante de adición y sus combinaciones. Como se explica más adelante, uno o más de los aminoácidos de los péptidos (por ejemplo, aminoácidos N-terminales y/o C-terminales) pueden ser opcionalmente modificados químicamente independientemente; en algunos ejemplos, uno o más aminoácidos de un péptido pueden modificarse químicamente, mientras que en otros ejemplos ninguno de los aminoácidos del péptido se modificará químicamente. La modificación puede ocurrir en el grupo amina (-NH<sub>2</sub>) del aminoácido N-terminal del péptido o secuencia peptídica (el grupo amina formaría un enlace péptido amida si estuviera presente internamente dentro de una secuencia peptídica en lugar de en la posición N-terminal). La modificación puede ocurrir en el grupo carboxi (-COOH) del aminoácido C-terminal del péptido o secuencia peptídica (cuyo grupo carboxi formaría un enlace péptido amida si estuviera presente internamente dentro de una secuencia peptídica en lugar de en la posición C-terminal). La modificación puede ocurrir tanto en el grupo amina N-terminal (-NH<sub>2</sub>) como en el grupo carboxílico C-terminal (-COOH). La secuencia de aminoácidos del péptido puede comenzar a partir del aminoácido N-terminal del péptido de la secuencia de referencia 1. Por ejemplo, los péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene entre 4 a 23 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia péptido 1, en donde la secuencia de aminoácidos comienza a partir del aminoácido N-terminal de la secuencia de referencia (es decir, péptido 2, péptido 4, péptido 7, péptido 11, péptido 16, péptido 22, péptido 29, péptido 37, péptido 46, péptido 56, péptido 67, péptido 79, péptido 92, péptido 106, péptido 121, péptido 137, péptido 154, péptido 172, péptido 191, o péptido 211); (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a). Estos péptidos no contienen una unidad estructural química o una unidad estructural química en la glicina N-terminal que no sea un grupo miristoílo. Preferiblemente, la unidad estructural química es un grupo acilo, en forma de un enlace amida, tal como un grupo acetilo, o grupo alquilo.

La secuencia de aminoácidos de los péptidos puede terminar en el aminoácido C-terminal de la secuencia de referencia péptido 1. Por ejemplo, los péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene entre 4 a 23 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia péptido 1, en donde la secuencia de aminoácidos termina en el aminoácido C-terminal de la secuencia de referencia (es decir, péptido 3, péptido 6, péptido 10, péptido 15, péptido 21, péptido 28, péptido 36, péptido 45, péptido 55, péptido 66, péptido 78, péptido 91, péptido 105, péptido 120, péptido 136, péptido 153, péptido 171, péptido 190, péptido 210 o péptido 231); (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a). En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos del péptido no comienza en el aminoácido N-terminal de la secuencia de referencia, péptido 1, (SEQ ID NO: 1), sino que comienza en el aminoácido en la posición 2 a través del aminoácido en la posición 21 de la secuencia de referencia péptido 1. Por ejemplo, los péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia péptido 1, en donde la secuencia de aminoácidos comienza en cualquier aminoácido entre la posición 2 a la posición 21 de la secuencia de referencia. Estos péptidos pueden tener una longitud de entre 4 y 23 aminoácidos contiguos y pueden representar péptidos en el medio de la secuencia de referencia, péptido 1; (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a). Estos péptidos se describen en las Tablas 1 o 2. Estos péptidos contienen una unidad estructural química en el aminoácido N-terminal que no es la glicina N-terminal de o equivalente a la glicina N-terminal de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. La unidad estructural química es un grupo acetilo.

Secuencias de aminoácidos peptídicos que son útiles para inhibir la hipersecreción de mucina en un mamífero, y que son útiles para reducir la cantidad de hipersecreción de mucina en un mamífero, y que son útiles en los métodos de inhibición de la hipersecreción de mucina y en los métodos de reducción de la hipersecreción de mucina incluyen secuencias de aminoácidos de péptidos aislados y secuencias de aminoácidos de péptidos que opcionalmente contienen grupos modificados químicamente N-terminales y/o C-terminales de la presente invención, secuencias de aminoácidos peptídicos que se seleccionan del grupo que consiste en los 23-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 23 aminoácidos): péptido 2; y péptido 3; los 22-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 22 aminoácidos): péptido 4; péptido 5; y péptido 6; los 21-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 21 aminoácidos): péptido 7; péptido 8; péptido 9; y péptido 10; los 20-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 20 aminoácidos): péptido 11; péptido 12; péptido 13; péptido 14; y péptido 15; los 19-meros (es decir, los péptidos que tienen una secuencia de 19 aminoácidos): péptido 16; péptido 17; péptido 18; péptido 19; péptido 20; y péptido 21; los 18-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 18 aminoácidos): péptido 22; péptido 23; péptido 25; péptido 26; péptido 27; y péptido 28; los 17-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 17 aminoácidos): péptido 29; péptido 30; péptido 31; péptido 32; péptido 33; péptido 34; péptido 35; y péptido 36; los 16-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia

de 16 aminoácidos): péptido 37; péptido 38; péptido 39; péptido 40; péptido 41; péptido 42; péptido 43; péptido 44; y péptido 45; los 15-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 15 aminoácidos): péptido 46; péptido 47; péptido 48; péptido 49; péptido 50; péptido 51; péptido 52; péptido 53; péptido 54; y péptido 55; los 14-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 14 aminoácidos): péptido 56; péptido 57; péptido 58; péptido 59; péptido 60; péptido 61; péptido 62; péptido 63; péptido 64; péptido 65; y péptido 66; los 13-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 13 aminoácidos): péptido 67; péptido 68; péptido 69; péptido 70; péptido 71; péptido 72; péptido 73; péptido 74; péptido 75; péptido 76; péptido 77; y péptido 78; los 12-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 12 aminoácidos): péptido 79; péptido 80; péptido 81; péptido 82; péptido 83; péptido 84; péptido 85; péptido 86; péptido 87; péptido 88; péptido 89; péptido 90; y péptido 91; los 11-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 11 aminoácidos): péptido 92; péptido 93; péptido 94; péptido 95; péptido 96; péptido 97; péptido 98; péptido 99; péptido 100; péptido 101; péptido 102; péptido 103; péptido 104; y péptido 105; los 10-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 10 aminoácidos): péptido 106; péptido 107; péptido 108; péptido 109; péptido 110; péptido 111; péptido 112; péptido 113; péptido 114; péptido 115; péptido 116; péptido 117; péptido 118; péptido 119; y péptido 120; los 9-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 9 aminoácidos): péptido 121; péptido 122; péptido 123; péptido 124; péptido 125; péptido 126; péptido 127; péptido 128; péptido 129; péptido 130; péptido 131; péptido 132; péptido 133; péptido 134; péptido 135; y péptido 136; los 8-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 8 aminoácidos): péptido 137; péptido 138; péptido 139; péptido 140; péptido 141; péptido 142; péptido 143; péptido 144; péptido 145; péptido 146; péptido 147; péptido 148; péptido 149; péptido 150; péptido 151; péptido 152; y péptido 153; los 7-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 7 aminoácidos): péptido 154; péptido 155; péptido 156; péptido 157; péptido 158; péptido 159; péptido 160; péptido 161; péptido 162; péptido 163; péptido 164; péptido 165; péptido 166; péptido 167; péptido 168; péptido 169; péptido 170; y péptido 171; los 6-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 6 aminoácidos): péptido 172; péptido 173; péptido 174; péptido 175; péptido 176; péptido 177; péptido 178; péptido 179; péptido 180; péptido 181; péptido 182; péptido 183; péptido 184; péptido 185; péptido 186; péptido 187; péptido 188; péptido 189; y péptido 190; los 5-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 5 aminoácidos): péptido 191; péptido 192; péptido 193; péptido 194; péptido 195; péptido 196; péptido 197; péptido 198; péptido 199; péptido 200; péptido 201; péptido 202; péptido 203; péptido 204; péptido 205; péptido 206; péptido 207; péptido 208; péptido 209; y péptido 210; y los 4-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 4 aminoácidos): péptido 211; péptido 212; péptido 213; péptido 214; péptido 215; péptido 216; péptido 217; péptido 218; péptido 219; péptido 220; péptido 221; péptido 222; péptido 223; péptido 224; péptido 225; péptido 226; péptido 227; péptido 228; péptido 229; péptido 230; y el péptido 231. Las secuencias de aminoácidos de péptidos aislados y de péptidos modificados químicamente N-terminal y/o C-terminal se seleccionan del grupo que consiste en los 23-meros: péptido 2; y péptido 3; los 22-meros: péptido 4; péptido 5; y péptido 6; los 21-meros: péptido 7; péptido 8; péptido 9; y péptido 10; los 20-meros: péptido 11; péptido 12; péptido 13; péptido 14; y péptido 15; los 19-meros: péptido 16; péptido 17; péptido 18; péptido 19; péptido 20; y péptido 21; los 18-meros: péptido 22; péptido 23; péptido 24; péptido 25; péptido 26; péptido 27; y péptido 28; los 17-meros: péptido 29; péptido 30; péptido 31; péptido 32; péptido 33; péptido 34; péptido 35; y péptido 36; los 16-meros: péptido 37; péptido 38; péptido 39; péptido 40; péptido 41; péptido 42; péptido 43; y péptido 44; los 15-meros: péptido 45; los 14-meros: péptido 46; péptido 47; péptido 48; péptido 49; péptido 50; péptido 51; péptido 52; péptido 53; y péptido 54; los 13-meros: péptido 55; péptido 56; péptido 57; péptido 58; péptido 59; péptido 60; péptido 61; péptido 62; péptido 63; y péptido 64; los 12-meros: péptido 65; péptido 66; péptido 67; péptido 68; péptido 69; péptido 70; péptido 71; péptido 72; péptido 73; péptido 74; y péptido 75; los 11-meros: péptido 76; péptido 77; péptido 78; péptido 79; péptido 80; péptido 81; péptido 82; péptido 83; péptido 84; péptido 85; péptido 86; y péptido 87; los 10-meros: péptido 88; péptido 89; péptido 90; péptido 91; péptido 92; péptido 93; péptido 94; péptido 95; péptido 96; péptido 97; péptido 98; péptido 99; y péptido 100; los 9-meros: péptido 101; péptido 102; péptido 103; péptido 104; péptido 105; y péptido 106; los 8-meros: péptido 107; péptido 108; péptido 109; péptido 110; péptido 111; péptido 112; péptido 113; y péptido 114; los 7-meros: péptido 115; péptido 116; péptido 117; péptido 118; y péptido 119; los 6-meros: péptido 120; péptido 121; péptido 122; péptido 123; péptido 124; péptido 125; péptido 126; péptido 127; péptido 128; y péptido 129; los 5-meros: péptido 130; péptido 131; péptido 132; péptido 133; y péptido 134; los 4-meros: péptido 135; y el péptido 136. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos aislados y de los péptidos modificados químicamente del extremo N y/o del terminal C incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en los 23-meros: péptido 2; y péptido 3; los 22-meros: péptido 4; péptido 5; y péptido 6; los 21-meros: péptido 7; péptido 8; péptido 9; y péptido 10; los 20-meros: péptido 11; péptido 12; péptido 13; péptido 14; y péptido 15; los 19-meros: péptido 16; péptido 17; péptido 18; péptido 19; péptido 20; y péptido 21; los 18-meros: péptido 22; péptido 23; péptido 24; péptido 25; péptido 26; péptido 27; y péptido 28; los 17-meros: péptido 29; péptido 30; péptido 31; péptido 32; péptido 33; péptido 34; péptido 35; y péptido 36; los 16-meros: péptido 37; péptido 38; péptido 39; péptido 40; péptido 41; péptido 42; péptido 43; péptido 44; y péptido 45; los 15-meros: péptido 46; péptido 47; péptido 48; péptido 49; péptido 50; péptido 51; péptido 52; péptido 53; y péptido 54; los 14-meros: péptido 55; péptido 56; péptido 57; péptido 58; péptido 59; péptido 60; péptido 61; péptido 62; péptido 63; y péptido 64; los 13-meros: péptido 65; péptido 66; péptido 67; péptido 68; péptido 69; péptido 70; péptido 71; péptido 72; péptido 73; péptido 74; péptido 75; péptido 76; péptido 77; péptido 78; péptido 79; péptido 80; péptido 81; péptido 82; péptido 83; péptido 84; péptido 85; péptido 86; y péptido 87; los 11-meros: péptido 88; péptido 89; péptido 90; péptido 91; péptido 92; péptido 93; péptido 94; péptido 95; péptido 96; péptido 97; péptido 98; péptido 99; y péptido 100; los 10-meros: péptido 101; péptido 102; péptido 103; péptido 104; péptido 105; y péptido 106; los 9-meros: péptido 107; péptido 108; péptido 109; péptido 110; péptido 111; péptido 112; péptido 113; y péptido 114; los 8-meros: péptido 115; péptido 116; péptido 117; péptido 118; y péptido 119; los 7-meros: péptido 120; péptido 121; péptido 122; péptido 123; péptido 124; y péptido 125; los 6-meros: péptido 126; péptido 127; péptido 128; y péptido 129; los 5-meros: péptido 130; péptido 131; y péptido 132; los 4-meros: péptido 133; y el péptido 134. La secuencia de aminoácidos de los péptidos puede incluir los residuos contiguos A, K, G y E como en el péptido 219 de la secuencia de referencia péptido 1. Por ejemplo, los péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia péptido 1, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido incluye los residuos contiguos A, K, G y E como en el péptido 219 del

péptido de referencia 1 ( por ejemplo, péptido 219, péptido 45, péptido 79, péptido 67, péptido 80, etc.); (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a). Los ejemplos de segmentos peptídicos que contienen la secuencia de aminoácidos AKGE de la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia, péptido 1, incluyen (a) los 23-meros: péptido 2; y péptido 3; los 22-meros: péptido 4; péptido 5; y péptido 6; los 11-meros: péptido 7; péptido 8; péptido 9; y péptido 10; los 20-meros: péptido 11; péptido 12; péptido 13; péptido 14; y péptido 15; los 19-meros: péptido 16; péptido 17; péptido 18; péptido 19; péptido 20; y péptido 21; los 18-meros: péptido 22; péptido 23; péptido 24; péptido 25; péptido 26; péptido 27; y péptido 28; los 17-meros: péptido 29; péptido 30; péptido 31; péptido 32; péptido 33; péptido 34; péptido 35; y péptido 36; los 16-meros: péptido 37; péptido 38; péptido 39; péptido 40; péptido 41; péptido 42; péptido 43; péptido 44; y péptido 45; los 15-meros: péptido 46; péptido 47; péptido 48; péptido 49; péptido 50; péptido 51; péptido 52; péptido 53; y péptido 54; los 14-meros: péptido 56; péptido 57; péptido 58; péptido 59; péptido 60; péptido 61; péptido 62; péptido 63; y péptido 64; los 13-meros: péptido 67; péptido 68; péptido 69; péptido 70; péptido 71; péptido 72; péptido 73; péptido 74; y péptido 75; los 12-meros: péptido 79; péptido 80; péptido 81; péptido 82; péptido 83; péptido 84; péptido 85; péptido 86; y péptido 87; los 11-meros: péptido 93; péptido 94; péptido 95; péptido 96; péptido 97; péptido 98; péptido 99; y péptido 100; los 10-meros: péptido 108; péptido 109; péptido 110; péptido 111; péptido 112; péptido 113; y péptido 114; los 9-meros: péptido 124; péptido 125; péptido 126; péptido 127; péptido 128; y péptido 129; los 8-meros: péptido 141; péptido 142; péptido 143; péptido 144; y péptido 145; los 7-meros: péptido 159; péptido 160; péptido 161; y péptido 162; los 6-meros: péptido 178; péptido 179; y péptido 180; los 5-meros: péptido 198; y péptido 199; y el 4-mero: péptido 219, (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), variante que se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de eliminación, una variante de adición y combinaciones de las mismas, en donde el segmento comprende o consiste en 4 a 23 aminoácidos contiguos. Las secuencias peptídicas como se divulgan en el presente documento o como se definen en el primer aspecto incluyen aquellas que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 10 a 23 aminoácidos contiguos de la secuencia de referencia, el péptido 1; (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), variante que se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de eliminación, una variante de adición, y combinaciones de las mismas, en donde las secuencias de aminoácidos preferidas comprenden la 23-mero: péptido 2; el 22-mero: péptido 4; el 21-mero: péptido 7; el 20-mero: péptido 11; el 19-mero: péptido 16; el 18-mero: péptido 22; el 17-mero: péptido 29; el 16-mero: péptido 37; el 15-mero: péptido 46; el 14-mero: péptido 56; el 13-mero: péptido 67; el 12-mero: péptido 79; el 11-mero: péptido 92; y el 10-mero: péptido 106. En realizaciones adicionales, la secuencia de aminoácidos del péptido como se define en el primer aspecto comienza a partir del aminoácido N-terminal del péptido 1 de la secuencia de referencia e incluye los residuos contiguos A, K, G y E como en el péptido 219 de la secuencia de referencia péptido 1, mientras que en otras realizaciones la secuencia de aminoácidos del péptido termina en el aminoácido C-terminal de la secuencia de referencia péptido 1 e incluye los residuos contiguos A, K, G y E como en el péptido 219 de la referencia secuencia péptido 1. Los péptidos pueden incluir una o más eliminaciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. Preferiblemente, las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas, o las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos no conservativas. Los péptidos, incluidos los péptidos con secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas o variantes de la secuencia de aminoácidos de referencia, no tendrán eliminaciones o adiciones en comparación con los correspondientes aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de referencia, pero pueden tener sustituciones conservadoras o no conservativas. Las sustituciones de aminoácidos que pueden realizarse en la secuencia de aminoácidos de referencia en los péptidos de la invención incluyen, entre otros, los siguientes: la alanina (A) puede estar sustituida con lisina (K), valina (V), leucina (L), o isoleucina (I); el ácido glutámico (E) puede estar sustituido con ácido aspártico (D); la glicina (G) puede estar sustituida con prolina (P); la lisina (K) puede estar sustituida con arginina (R), glutamina (Q) o asparagina (N); la fenilalanina (F) puede estar sustituida por leucina (L), valina (V), isoleucina (I) o alanina (A); la prolina (P) puede estar sustituida con glicina (G); la glutamina (Q) puede estar sustituida con ácido glutámico (E) o asparagina (N); la arginina (R) puede estar sustituida con lisina (K), glutamina (Q) o asparagina (N); la serina (S) puede estar sustituida con treonina; la treonina (T) puede estar sustituida con serina (S); y la valina (V) puede estar sustituida por leucina (L), isoleucina (I), metionina (M), fenilalanina (F), alanina (A) o norleucina (Nle). Por ejemplo, las sustituciones que se podrían hacer a la secuencia de aminoácidos de referencia en los péptidos de la invención incluyen sustituir alanina (A) por fenilalanina (F) (por ejemplo, en la posición del aminoácido 4 de la secuencia de aminoácidos de referencia), ácido glutámico (E) para glutamina (Q) (por ejemplo, en la posición de aminoácido 3 de la secuencia de aminoácidos de referencia), lisina (K) para alanina (A) (por ejemplo, en las posiciones de aminoácidos 2 y/u 8 de la secuencia de aminoácidos de referencia), y/o serina (S) para treonina (T) (por ejemplo, en la posición de aminoácido 7 de la secuencia de aminoácidos de referencia). Cuando se incluyen sustituciones en las secuencias de aminoácidos de los péptidos (cuyos péptidos comprenden no modificados, así como los péptidos que se modifican químicamente, por ejemplo, por modificación N-terminal y/o C-terminal, tal como por formación de amida) con respecto al amino de referencia secuencia ácida, preferiblemente hay al menos un 80% de identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos del péptido y la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 5 a 23 aminoácidos y que incluyen una sustitución de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 80% a aproximadamente 96% (es decir, ~95.7%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 10 a 23 aminoácidos y que incluyen una sustitución de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 90% a aproximadamente 96% (es decir, ~95.7%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen una sustitución de un aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 95% a aproximadamente 96%

(es decir, ~95.7%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 10 a 23 aminoácidos y que incluyen dos sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 80% a aproximadamente 92% (es decir, ~91.3%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 16 a 23 aminoácidos y que incluyen dos sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 87.5% a aproximadamente 92% (es decir, ~91.3%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen 20 a 23 aminoácidos y que incluyen dos sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 90% a aproximadamente 92% (es decir, ~91.3%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 15 a 23 aminoácidos e incluyen tres sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 80% y aproximadamente 87% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos e incluyen tres sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 85% a aproximadamente 87% con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos e incluyen cuatro sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 80% a aproximadamente 83% (es decir, ~82.6%) con la secuencia de aminoácidos de referencia.

Con respecto a la secuencia de aminoácidos contigua del péptido de referencia (que es un 24-mero), la sustitución de un aminoácido en una secuencia contigua de 23 aminoácidos (un 23-mero) seleccionada de la secuencia de referencia de 24 aminoácidos proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de 95.65% (o ~96%) con el segmento de aminoácido en el péptido de referencia con el que el 23-mero tiene identidad. De manera análoga, la sustitución de dos, tres, cuatro y cinco aminoácidos en dicho 23-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 91.30% (o ~91%), 86.96% (o ~87%), 82.61% (o ~83%), y 78.27% (o ~78%) de identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, tres, cuatro y cinco aminoácidos en un 22-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 95.45% (o ~95%), 90.91% (o ~91%), 86.36% (o ~86%), 81.82% (o ~82%), y 77.27% (o ~77%) de identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos, tres, cuatro y cinco aminoácidos en un 21-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 95.24% (~95%), 90.48 (~91%), 85.71% (~86%), 80.95 (~81%) y 76.19% (~76%) de identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos, tres, cuatro y cinco aminoácidos en un 20-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 95.00% (95%), 90.00% (90%), 85.00% (85%), 80.00% (80%) y 75.00% (75%) de identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos, tres y cuatro aminoácidos en un 19-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 94.74% (~95%), 89.47% (~89%), 84.21% (84%), y 78.95% (~79%) de identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos, tres y cuatro aminoácidos en un 18-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 94.44% (~94%), 88.89% (~89%), 83.33% (83%), y 77.78% (~78%) de identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos, tres y cuatro aminoácidos en un 17-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 94.12% (~94%), 88.23% (~88%), 82.35% (82%), y 76.47% (~76%) de identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos, tres y cuatro aminoácidos en un 16-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 93.75% (~94%), 87.50% (~88%), 81.25% (~81%), y 75.00% (75%) de identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos y tres aminoácidos en un 15-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 93.33% (~93%), 86.67% (~87%) y 80.00% (80%) identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos y tres aminoácidos en un 14-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 92.86% (~93%), 85.71% (~86%) y 78.57% (79%) identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos y tres aminoácidos en un 13-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 92.31% (~92%), 84.62% (~85%) y 76.92% (~77%) identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno, dos y tres aminoácidos en un 12-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 91.67% (~92%), 83.33% (~83%) y 75.00% (75%) identidad de secuencia, respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno y dos aminoácidos en un 11-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 90.91% (~91%) y 81.82% (~82%), respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno y dos aminoácidos en un 10-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 90.00% (90%) y 80.00% (80%), respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno y dos aminoácidos en un 9-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de 88.89% (~89%) y 77.78% (~78%), respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de uno y dos aminoácidos en un 8-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de 87.50% (~88%) y 75.00% (75%), respectivamente, a la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. De manera análoga, la sustitución de un aminoácido en un 7-mero, 6-mero, 5-mero y 4-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene

un 85.71% (~86%), 83.33% (~83.3%), 80.00% (80%), y 75.00% (75%) de identidad de secuencia, respectivamente, al péptido de referencia. Las secuencias de aminoácidos preferidas tienen más del 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos en la secuencia de referencia, más preferiblemente entre 81% y 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos en la secuencia de referencia, y más preferiblemente entre 80% y 96% de identidad de la secuencia a la secuencia de aminoácidos en la secuencia de referencia. Las secuencias de aminoácidos preferidas pueden estar opcionalmente unidas químicamente en el extremo N en el grupo amino peptídico terminal a una unidad estructural de ácido carboxílico alifático lineal de C2 a C22, más preferiblemente a una unidad estructural de ácido carboxílico alifático lineal de C2 a C16, lo más preferiblemente a una unidad estructural C2 o C16 ácido carboxílico alifático lineal, mediante un enlace amida y, opcionalmente, un enlace químico en el extremo C terminal en el grupo carboxílico del péptido terminal a una amina tal como amoniaco o una amina primaria o secundaria tal como una amina primaria alifática lineal de C1 a C16, por una amida enlace.

Ejemplos de variantes de sustitución del péptido 79, un 12-mero, incluyen, por ejemplo, el péptido 238, donde Q en la posición 3 en el péptido 79 ha sido sustituido por E en la secuencia 238; péptido 233, donde A en la posición 2 en el péptido 79 ha sido sustituido por K en el péptido 233; péptido 234, donde A en la posición 8 en el péptido 79 ha sido sustituido por K en el péptido 234; el péptido 235, donde A en las posiciones 2 y 8 en el péptido 79 se han sustituido por K en el péptido 235; péptido 237, donde F en la posición 4 en el péptido 79 ha sido sustituido por A en el péptido 237; el péptido 239, donde K en la posición 10 en el péptido 79 ha sido sustituido por A en el péptido 239; péptido 240, donde G en la posición 11 en el péptido 79 ha sido sustituido por A en el péptido 240; y el péptido 241, donde E en la posición 12 en el péptido 79 ha sido sustituido por A en el péptido 241. Ejemplos de variantes de sustitución del péptido 106, un 10-mero, incluyen, por ejemplo, el péptido 236, donde F en la posición 4 en el péptido 106 se ha sustituido por A en el péptido 236; péptido 242, donde G en la posición 1 en el péptido 106 se ha sustituido por A en el péptido 242; péptido 243, donde Q en la posición 3 en el péptido 106 se ha sustituido por A en el péptido 243; péptido 244, donde S en la posición 5 en el péptido 106 se ha sustituido por A en el péptido 244; péptido 245, donde K en la posición 6 en el péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 245; péptido 247, donde T en la posición 7 en el péptido 106 se ha sustituido por A en el péptido 247; péptido 248, donde K en la posición 10 en el péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 248; el péptido 249, donde K en las posiciones 6 y 10 en el péptido 106 se han sustituido, cada uno por A, en el péptido 249. Ejemplos de una variante de sustitución del péptido 137, un 8-mero, incluyen, por ejemplo, el péptido 250, donde F en la posición 4 en el péptido 137 ha sido sustituido por A en el péptido 250.

Ejemplos de una variante de sustitución del péptido 219, un 4-mero, incluyen, por ejemplo, el péptido 251, donde K en la posición 2 en el péptido 219 ha sido sustituido por A en el péptido 251.

Un péptido variante de sustitución tal como se describe en el presente documento puede estar en forma de un péptido aislado o en forma de un péptido modificado químicamente tal como, por ejemplo, una amida N-terminal tal como una amidoilamida, una acetilamida, y similares como se describe en el presente documento, y tal como, por ejemplo, una amida C-terminal tal como una amida formada con amoniaco, y tal como tanto una amida N-terminal y una amida C-terminal. Los péptidos como se definen en el primer aspecto comprenden un grupo acetilo N-terminal.

Con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia, donde se incluyen las eliminaciones, preferiblemente hay al menos un 80% de identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos del péptido a la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 5 a 23 aminoácidos y que incluyen una eliminación de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán una identidad de secuencia de entre el 80% y aproximadamente el 96% (es decir, ~95.7%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 10 a 23 aminoácidos y que incluyen una eliminación de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 90% a aproximadamente 96% (es decir, ~95.7%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen una eliminación de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán una identidad de secuencia de entre el 95% y el 96% (es decir, ~95.7%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 10 a 23 aminoácidos y que incluyen dos eliminaciones de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 80% a aproximadamente 92% (es decir, ~91.3%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 16 a 23 aminoácidos e incluyen dos eliminaciones de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 87.5% a aproximadamente 92% (es decir, ~91.3%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos e incluyen dos eliminaciones de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 90% a aproximadamente 92% (es decir, ~91.3%) con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 15 a 23 aminoácidos e incluyen tres eliminaciones de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 80% y aproximadamente 87% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos e incluyen tres eliminaciones de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 85% y aproximadamente 87% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos e incluyen cuatro eliminaciones de aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán una identidad de secuencia de aproximadamente 80% a aproximadamente 83% (es decir, ~82.6%) con la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se indicó anteriormente, uno o más de los aminoácidos de los péptidos también pueden modificarse químicamente. Cualquier modificación de aminoácidos conocida en la técnica se puede hacer a los aminoácidos de los péptidos usando cualquier método conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal puede modificarse. Por ejemplo, el aminoácido C-terminal de los péptidos puede amidarse o esterificarse en el grupo carboxilo C-terminal (-COOH). El aminoácido C-terminal de los péptidos también puede modificarse químicamente. Por ejemplo, el grupo carboxilo C-terminal del aminoácido C-terminal puede modificarse químicamente por conversión a un grupo carboxamida en lugar del grupo carboxilo (es decir, amidado).

5 En algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal no se modifica químicamente. En algunas realizaciones, el grupo N-terminal está acetilado y el grupo C-terminal no está modificado. En algunas realizaciones, tanto el grupo N-terminal como el grupo C-terminal se modifican.

Un péptido como se describe en el presente documento puede acilarse en el grupo amino del aminoácido N-terminal para formar una amida N-terminal con un ácido seleccionado del grupo que consiste en:

10 (i-a) un ácido carboxílico alifático C2 (acetilo) a C13 (saturado u opcionalmente insaturado) (por ejemplo, una amida N-terminal con ácido acético (que es un grupo preferido), con ácido propanoico, con ácido butanoico, con ácido hexanoico, con ácido octanoico, con ácido decanoico, con ácido dodecanoico) que puede ser lineal, ramificado (mayor que C3), o que comprende un anillo (mayor que C3);

(i-b) un ácido carboxílico alifático C14 saturado, que puede ser lineal, ramificado o comprender un anillo;

15 (i-c) un ácido carboxílico alifático C14 insaturado, que puede ser lineal, ramificado o comprender un anillo;(i-d) ácido carboxílico alifático (saturado u opcionalmente insaturado) C15 a C24, que puede ser lineal, ramificado o comprender un anillo (por ejemplo, con ácido tetradecanoico (ácido mirístico, que es un grupo preferido), con ácido hexadecanoico, con ácido 9-hexadecenoico, con ácido octadecanoico, con ácido 9 octadecenoico, con ácido 11 octadecenoico, con ácido 9,12-octadecadienoico, con ácido 9,12,15-octadecatrienoico, con ácido 6,9,12- octadecatrienoico, con ácido eicosanoico, con ácido 9-eicosenoico, con ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, con ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, con ácido docosanoico, con ácido 13-docosenoico, con ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico, con ácido tetracosanoico, y similares);

(ii) ácido trifluoroacético;

25 (iii) ácido benzoico; y(iv-a) un ácido alifático alquil-sulfónico de C1 a C12 que forma una alquil-sulfonamida alifática, en donde la estructura de la cadena alquil-carbonada alifática de C1 a C12 del ácido sulfónico es análoga a la de las cadenas de ácido alquil-carboxílico alifáticas en el ácido alquil-carboxilato alifático descritos anteriormente. Por ejemplo, un péptido se puede acilar utilizando un grupo ácido carboxílico representado como alquilo (C1-C11)-C(O)OH a través de un acoplamiento deshidratante mediante la activación del grupo ácido carboxílico para formar una amida representada como (C1-C11-alquil-C(O)-NH-péptido. Análogamente, una sulfonamida puede formarse haciendo reaccionar una especie de ácido sulfónico (representado como (C1-C12)-alquil-S(O2)-X, por ejemplo, donde X es halógeno u OCH3 u otro grupo saliente compatible) con un grupo amino N-terminal para formar una sulfonamida representada como (C1-C12)-alquil-S(O2)-NH-péptido.(iv-b) un ácido alifático alquil-sulfónico C14 a C24 que forma una alquil-sulfonamida alifática, en donde la estructura de la cadena de alquil-carbonos alifáticos C14 a C24 del ácido sulfónico es análoga a la de las cadenas de ácido alquil-carboxílico alifáticas en el alquil-carboxilato alifático ácidos descritos anteriormente. Por ejemplo, un péptido se puede acilar utilizando un grupo ácido carboxílico representado como (C13-C23)-alquil-C(O)OH a través de un acoplamiento deshidratante mediante la activación del grupo ácido carboxílico para formar una amida representado como (C13-C23)-alquil-C(O)-NH-péptido.

De manera análoga, se puede formar una sulfonamida haciendo reaccionar una especie de ácido sulfónico (representado como (C14-C24)-alquil-S(O2)-X, por ejemplo, donde X es halógeno u OCH3 u otro grupo saliente compatible) con un grupo N-terminal amino para formar una sulfonamida representada como (C14-C24)-alquil-S(O2)-NH-péptido.

El aminoácido N-terminal se puede alquilar con un grupo alquilo alifático de C1 a C12, cuya estructura es un grupo alquilo alifático como se describe anteriormente. La alquilación se puede efectuar, por ejemplo, usando un haluro de alquilo alifático o un éster de ácido alquil-sulfónico alifático (mesilato, tosilato, etc.), preferiblemente usando un haluro de alquilo primario o un éster de ácido alquilsulfónico primario. El aminoácido N-terminal también puede modificarse en el amino terminal para incluir cualquier grupo acilo o acilo graso acilo alifático como una amida, incluyendo un grupo acetilo (es decir, -C(O)CH3, que es un grupo preferido), un grupo miristoilo (que es un grupo preferido), un grupo butanoilo, un grupo octanoilo, un grupo octanoilo, un grupo decanoilo, un grupo dodecanoilo, un grupo tetradecanoilo, un grupo hexadecanoilo, un grupo 9-hexadecenoilo, un grupo octadecanoilo, un grupo 9-octadecenoilo, un grupo 11-octadecenoilo, un grupo 9,12-octadecadienoilo, un grupo 9,12,15-octadecatrienoilo, un grupo 6,9,12-octadecatrienoilo, un grupo eicosanoilo, un grupo 9-eicosenoilo, un grupo 5,8,11,14-eicosatetraenoilo, un grupo 5,8,11,14,17-eicosapentaenoilo, un grupo docosanoilo, un grupo 13-docosenoilo, un grupo 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoilo, un grupo tetracosanoilo, grupos que se unen covalentemente al grupo amino terminal del péptido mediante un enlace amida.

El grupo ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal de los péptidos como se define en el primer aspecto también puede modificarse químicamente. Por ejemplo, el aminoácido C-terminal puede modificarse químicamente por reacción del grupo ácido carboxílico C-terminal del péptido con una amina para formar un grupo amida tal como una amida de amoniaco que es un grupo preferido; una amida de una alquilamina alifática C1 a C12, preferiblemente una alquilamina alifática lineal; una amida de una alquil-amina alifática C2 a C12 sustituida con hidroxilo; una amida de un grupo lineal 2-(alquil C1-C12 alifático) oxietilamina; y una amida de un grupo omega-metoxi-poli(etileno)xi) n-etilamina (también

denominado grupo omega-metoxi-PEG-alfa-amina o un grupo omega-metoxi-(polietilenglicol)amina), donde n es de 0 a 10. El grupo ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal del péptido también puede estar en forma de un éster seleccionado del grupo que consiste en un éster de un alcohol alquílico alifático C1 a C12 y un éster de un grupo 2-(omega-metoxi-poli(etilenoxi)n)-etanol (MPEG), donde n es de 0 a 10. En un aspecto, un componente de polietilenglicol tal como en un éster de PEG, un éster de MPEG, una amida de PEG, una amida de MPEG y similares tienen preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 500 a 40000 Daltons, más preferiblemente de 1000 a 25000 Daltons, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 10000 Daltons.

El grupo de ácido carboxílico C-terminal en el péptido, que puede estar representado por la fórmula péptido-C(O)OH, también puede amidarse por conversión a una forma activada como un haluro de ácido carboxílico, anhídrido de ácido carboxílico, N-hidroxisuccinimida, éster, éster pentafluorofenílico (OPfp), éster 3-hidroxi-2,3-dihidro-4-oxo-benzo-triazona (ODhbt), y similares para facilitar la reacción con amoníaco o una amina primaria o secundaria, preferiblemente amoníaco o un primario amina, y preferiblemente mientras que cualquier otro grupo reactivo en el péptido está protegido por grupos protectores químicamente compatibles sintéticos bien conocidos en la técnica de la síntesis de péptidos, especialmente de la síntesis en fase sólida peptídica, tal como un éster bencilico, un éster t-butílico, un fenilo éster, etc. Una amida peptídica resultante podría representarse por la fórmula péptido-C(O)-NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> (estando la amida en el extremo C-terminal del péptido) en donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno; alquilo de C1 a C12 tal como metilo, etilo, butilo, isobutilo, ciclopropilmetilo, hexilo, dodecilo, y opcionalmente más alto, por ejemplo, de C14 a C24, tal como tetradecilo, y similares como se describió anteriormente.

El ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal también se puede convertir en una amida de una alquil amina alifática C2 a C12 sustituida con hidroxilo (el grupo hidroxilo está unido a un átomo de carbono en lugar de un átomo de nitrógeno de la amina) tales como 2-hidroxi-etilamina, 4-hidroxi-butilamina y 12-hidroxi-dodecilamina, y similares.

El ácido carboxílico C-terminal también se puede convertir en una amida de una alquilamina alifática C2 a C12 sustituida con hidroxilo, en donde el grupo hidroxilo puede acilarse para formar un éster con un ácido carboxílico alifático C2 a C12 como se describe anteriormente. Preferiblemente, en la amida peptídica en el extremo C-terminal del péptido representado por la fórmula péptido C(O)NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, R<sub>5</sub> es hidrógeno y R<sub>6</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de C1 a C12 e hidroxilo sustituido alquilo C2 a C12.

El ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal se puede convertir en una amida de una 2-(alquil C1-C12 alifática alquilo)oxietilamina. Dicha amida se puede preparar, por ejemplo, por reacción de un alcohol alifático lineal de C1 a C12 con hidruro de potasio en diglima con 2-cloro-etanol para proporcionar un alquiletanol alifático de C1 a C12 lineal, que se puede convertir en una amina por oxidación a un aldehído, seguido de una aminación reductiva a una amina (por ejemplo, usando amoníaco), o por conversión a un haluro de alquilo (por ejemplo, usando cloruro de tionilo) seguido de un tratamiento con una amina como el amoníaco.

El ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal se puede convertir en una amida de una PEG-amina lineal (por ejemplo, omega-hidroxi-PEG-alfa-amina; omega-(C1-a-C12)-PEG-alfa-amina tal como omega-metoxi-PEG-alfa-amina, es decir, MPEG-amina). El componente de polietilenglicol o PEG tiene preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 500 a 40000 Daltons, más preferiblemente de 1000 a 25000 Daltons, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 10000 Daltons.

El ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal también se puede convertir en una amida de una omega-metoxi-poli(etilenoxi)n-etilamina, donde n es de 0 a 10, que puede prepararse a partir de el correspondiente omega-metoxi-poli(etilenoxi)n-etanol, por ejemplo, por conversión del alcohol en una amina como se describió anteriormente.

En otra realización, el carboxilo C-terminal se puede convertir en una amida representada por la fórmula péptido-C(O)-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, en donde R<sub>7</sub> es hidrógeno y R<sub>8</sub> es un grupo lineal 2-(alquil C1-C12 alifático)oxietilo en donde la porción alquilo alifática de C1 a C12 es como se describe anteriormente e incluye grupos tales como metoxietilo (es decir, CH<sub>3</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2-dodeciloxietilo y similares; o R<sub>7</sub> es hidrógeno y R<sub>8</sub> es un grupo omega-metoxi-poli(etilenoxi)n-etilo donde la n de la porción de poli(etilenoxi) es de 0 a 10, tal como 2-metoxietilo (es decir, CH<sub>3</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), omega-metoxietoxietilo (es decir, CH<sub>3</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) hasta CH<sub>3</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. El grupo ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal del péptido también puede estar en forma de un éster de un alcohol alquílico alifático C1 a C12, siendo la porción alquilo alifática del alcohol como se describe anteriormente. El grupo ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal del péptido también puede estar en forma de un éster de un grupo 2-(omega-metoxi-poli(etilenoxi)n)-etanol donde n es de 0 a 10, que puede prepararse a partir de la reacción del 2-metoxietanol en forma de un 2-metoxietanolato de sodio con cantidades estequiométricas de óxido de etileno, dependiendo la cantidad estequiométrica del tamaño de n.

Una cadena lateral en un aminoácido de los péptidos también puede modificarse químicamente. Por ejemplo, un grupo fenilo en fenilalanina o tirosina puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en:

un grupo alquilo alifático de C1 a C24 (es decir, lineal o ramificado, y/o saturado o insaturado, y/o que contiene un grupo cíclico) tal como metilo (preferido), etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, ciclopropilo, 2-metilciclopropilo, ciclohexilo, octilo, decilo, dodecilo, hexadecilo, octadecilo, eicosanilo, docosanilo, tetracosanilo, 9-hexadecenilo, 9-octadecenilo, 11-

octadecenilo, 9,12-octadecadienilo, 9,12,15-octadecatrienilo, 6,9,12-octadecatrienilo, 9-eicosenilo, 5,8,11,14-eicosatetraenilo, 5,8,11,14,17-eicosapentaenilo, 13-docosenilo y 4,7,10,13,16,19-docosahexaenilo;

un grupo alquilo alifático C1 a C12 sustituido con un grupo hidroxilo, al menos un átomo de carbono alejado de un sitio de insaturación, ejemplos de grupo hidroxialquilo que incluyen hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxidodecilo y similares;

- 5 un grupo alquilo C1 a C12 sustituido con un grupo hidroxilo que está esterificado con un grupo carboxilo alifático C2 a C25 de un ácido tal como ácido acético, ácido butanoico, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico, ácido 9-hexadecenoico, ácido octadecanoico, ácido 9-octadecenoico, ácido 11-octadecenoico, ácido 9,12-octadecadienoico, ácido 9,12,15-octadecatrienoico, ácido 6,9,12-octadecatrienoico, ácido eicosanoico, ácido 9-eicosanoico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, ácido docosanoico, ácido 13-docosenoico, ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico, ácido tetracosanoico, y similares, un ácido dicarboxílico tal como ácido succínico, o un hidroxiaácido tal como ácido láctico, en donde el número total de átomos de carbono del sustituyente éster está entre 3 y 25;

halógeno tal como flúor, cloro, bromo y yodo; nitro-;

amino, tales como NH<sub>2</sub>, metilamino, dimetilamino; trifluorometilo;

- 15 carboxilo (-COOH);

un alcoxi de C1 a C24 (tal como puede formarse por alquilación de tirosina) tal como metoxi, etoxi, propiloxi, isopropiloxi, butiloxi, isobutiloxi, ciclopropiloxi, 2-metoxiciclopropiloxi, ciclohexiloxi, octiloxi, deciloxi, dodeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, eicosaniloxi, docosaniloxi, tetracosaniloxi, 9-hexadeceniloxi, 9-octadeceniloxi, 11-octadeceniloxi, 9,12-octadecadieniloxi, 9,12,15-octadecatrieniloxi, 6,9,12-octadecatrieniloxi, 9-eicoseniloxi, 5,8,11,14-eicosatetraeniloxi, 5,8,11,14,17-eicosapentaeniloxi, 13-docoseniloxi, y 4,7,10,13,16,19-docosahexaeniloxi; y

20

un hidroxialquilo C2 a C12 tal como 2-hidroxietiloxi y sus ésteres con ácidos carboxílicos como se describió anteriormente o con ácido trifluoroacético.

Un grupo hidroxilo de serina se puede esterificar con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en:

un grupo ácido carboxílico alifático C2 a C12 tal como se describe anteriormente;

- 25 un grupo ácido trifluoroacético; y

un grupo de ácido benzoico.

El grupo amino épsilon en lisina puede modificarse químicamente, por ejemplo, por formación de amida con: un grupo de ácido carboxílico alifático C2 a C12 (por ejemplo, por reacción de la amina con una forma químicamente activada de un ácido carboxílico tal como un cloruro de ácido, un anhídrido, un éster de N-hidroxisuccinimida, un éster de pentafluorofenilo (OPfp), un éster de 3-hidroxi-2,3-dihidro-4-oxo-benzo-triazona (ODhbt), y similares) como los descritos anteriormente, o un grupo de ácido benzoico, o un grupo de aminoácidos. Además, el grupo amino épsilon en la lisina puede modificarse químicamente por alquilación con uno o dos grupos alquilo alifáticos de C1 a C4.

30

El grupo ácido carboxílico en el ácido glutámico puede modificarse mediante la formación de una amida con una amina tal como: amoniaco; una alquil amina alifática primaria de C1 a C12 (cuya porción alquilo es como se describió anteriormente) incluida con metilamina; o un grupo amino de un aminoácido.

35

El grupo ácido carboxílico en el ácido glutámico puede modificarse mediante la formación de un éster con un grupo hidroxialquilo alifático C1 a C12 como se describe anteriormente, preferiblemente un éster con un alcohol primario de un alquilo alifático C1 a C12 como metanol, etanol, propan-1-ol, n-dodecanol y similares como se describe anteriormente.

40

En este documento se describe un método para inhibir la liberación de al menos un mediador inflamatorio de un gránulo en al menos una célula inflamatoria en un tejido y/o fluido de un sujeto que comprende la administración a dicho tejido y/o fluido de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: 1. (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de una secuencia de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1);

45

2. (b) una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1); y

3. (c) una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia definida en (a), en donde el aminoácido C-terminal del péptido está opcionalmente modificado químicamente independientemente, y el aminoácido N-terminal del péptido se modifica de forma independiente químicamente por acilación con un ácido carboxílico seleccionado del grupo que consiste en un alifático saturado o insaturado C2 a C13 ácido carboxílico, un ácido carboxílico alifático C14 saturado (ácido mirístico) o insaturado, un ácido carboxílico alifático saturado o insaturado C15 a C24 y ácido trifluoroacético, o no se modifica químicamente, con la condición de que dicho péptido pueda modificarse por acilación cuando su secuencia de aminoácidos comienza con la secuencia GAQF de la secuencia de referencia por acilación solo con un ácido carboxílico

50

5 seleccionado del grupo que consiste en un ácido carboxílico alifático saturado o insaturado C2 a C13, un ácido carboxílico alifático insaturado C14, un ácido carboxílico alifático saturado o insaturado C15 a C24, y ácido trifluoroacético, o no está modificado químicamente, en donde dicho péptido, opcionalmente combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y en una cantidad reductora de la liberación del mediador inflamatorio terapéuticamente eficaz para reducir la liberación de dicho mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria en comparación con la liberación de dicho mediador inflamatorio de al menos uno del mismo tipo de célula inflamatoria que se produciría en ausencia de dicho al menos un péptido.

10 El método puede emplear un péptido que puede ser acetilado en el aminoácido alfa N-terminal. Este péptido puede consistir en al menos diez residuos de aminoácidos contiguos y preferiblemente está constituido por acetil-péptido 106 (SEQ ID NO: 106).

El método también emplea un péptido que consiste en al menos cuatro residuos de aminoácidos contiguos y más preferiblemente al menos seis residuos de aminoácidos contiguos. Además, el péptido puede ser miristoilado en el aminoácido alfa N-terminal cuando el péptido. El método también puede utilizar un péptido que puede amidarse con amoniaco en el aminoácido alfa C-terminal.

15 El método puede utilizar un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de una secuencia de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1), en donde el aminoácido N-terminal de la secuencia de aminoácidos de (a) se selecciona de la posición de aminoácido 2 a 21 de la secuencia de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1). Además, estos péptidos pueden estar miristoilados en el aminoácido alfa N-terminal y también pueden amidarse con amoniaco en el aminoácido alfa C-terminal.

20 La administración de un péptido como se describe en el presente documento que incluye un péptido como se define. En el primer aspecto define la reducción de la liberación de un mediador inflamatorio como el bloqueo o inhibición del mecanismo que libera un mediador inflamatorio de la célula inflamatoria en dicho sujeto.

25 La administración como se describe en el presente documento incluye incorporar o mezclar los péptidos descritos con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica.

30 La administración como se describe en este documento incluye la liberación de al menos una cantidad reductora de la liberación de un mediador inflamatorio para reducir la liberación de dicho mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria en comparación con la liberación de dicho mediador inflamatorio de al menos uno del mismo tipo de célula inflamatoria que se produciría en ausencia de dicho al menos un péptido. La célula inflamatoria en dicho sujeto puede ser un leucocito, un granulocito, un basófilo, un eosinófilo, un monocito, un macrófago o una combinación de los mismos.

35 El mediador inflamatorio liberado de al menos un gránulo de al menos una célula inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), eosinófilo peroxidasa (EPO), proteína básica principal [MBP], lisozima, granzima, histamina, proteoglicano, proteasa, factor quimiotáctico, citoquina, metabolito del ácido araquidónico, defensina, proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, fosfolipasa A<sub>2</sub>, sulfato condroitina-4-, proteinasa 3, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, receptor del complemento, N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP), receptor de laminina, citocromo b<sub>558</sub>, factor monocito-quimiotáctico, histaminasa, proteína de unión a la vitamina B12, gelatinasa, activador del plasminógeno, beta-D-glucuronidasa, y una combinación de los mismos. Preferiblemente, el mediador inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), eosinófilo peroxidasa (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima y una combinación de las mismas.

40 Una cantidad reductora de la liberación de un mediador inflamatorio eficaz de dicho péptido comprende una cantidad de péptido que inhibe la desgranulación que reduce la cantidad de un mediador inflamatorio liberado de al menos una célula inflamatoria de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% o preferiblemente de aproximadamente el 5-50% a aproximadamente el 99%, en comparación con la cantidad liberada por al menos una célula inflamatoria en ausencia del péptido.

45 El método descrito en el presente documento y los péptidos descritos en el presente documento son útiles para el tratamiento de un sujeto que padece o sufre una enfermedad respiratoria. Esta enfermedad respiratoria puede ser asma, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis quística. Los sujetos que pueden tratarse mediante la presente invención son preferiblemente mamíferos, tales como seres humanos, caninos, equinos y felinos.

50 La administración de los péptidos para su uso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención es por administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, administración nasal y administración oral. Más preferiblemente, la administración pulmonar comprende un aerosol, que puede generarse a partir de un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida o un nebulizador. Además, la administración al sujeto puede incluir además la administración de una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un compuesto antiviral, un compuesto antiparasitario, un compuesto antiinflamatorio y un inmunomodulador.

55 El método descrito en el presente documento también es útil para el tratamiento de un sujeto que padece o padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad intestinal, una enfermedad de la piel, una

enfermedad autoinmune, un síndrome de dolor y sus combinaciones. Más específicamente, la enfermedad intestinal se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable. Las enfermedades de la piel también tratables con el presente método incluyen rosácea, eczema, psoriasis y acné severo. Además, un sujeto que padece artritis también puede ser tratado mediante la presente invención.

- 5 En el presente documento también se describe la administración de péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a) que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de una secuencia de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1). Estos péptidos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 249, 250, 251 y 252. Estos péptidos pueden ser acetilados adicionalmente en el aminoácido alfa N-terminal o miristoilados en el aminoácido alfa N-terminal y opcionalmente amidado con amoníaco en el aminoácido alfa C-terminal.

El método descrito aquí es útil para reducir la hipersecreción de moco en un sujeto mediante la administración de los péptidos como se describe aquí para reducir también la hipersecreción de moco relacionada con MARCKS de al menos una célula o tejido secretor de moco en el sujeto, por lo que la hipersecreción de moco en el sujeto es reducida en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicha administración de dicho péptido.

- 15 En el presente documento se describe un péptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:(a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de una secuencia de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1);

(b) una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1); y

- 20 (c) una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia definida en (a), en donde el aminoácido C-terminal del péptido está opcionalmente modificado químicamente independientemente, y el aminoácido N-terminal del péptido se modifica independientemente químicamente por acilación con un ácido carboxílico seleccionado del grupo que consiste en un alifático saturado o insaturado C2 a C13 ácido carboxílico, un ácido carboxílico alifático saturado o insaturado C14, un ácido carboxílico alifático saturado o insaturado C15 y C24, y ácido trifluoroacético, o no está químicamente modificado, con la condición de que dicho péptido se modifique por acilación cuando comienza su secuencia de aminoácidos la secuencia GAQF de la secuencia de referencia por acilación solo con un ácido carboxílico seleccionado del grupo que consiste en un ácido carboxílico alifático saturado o insaturado C2 a C13, un ácido carboxílico alifático insaturado C14, un ácido carboxílico alifático saturado o insaturado C15 a C24, y ácido trifluoroacético, o no está modificado químicamente, en donde dicho péptido, opcionalmente combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, y en una cantidad de reductor de la liberación del mediador inflamatorio terapéuticamente eficaz para reducir la liberación de dicho mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria en comparación con la liberación de dicho mediador inflamatorio de al menos uno del mismo tipo de célula inflamatoria que ocurriría en ausencia de dicho al menos un péptido.

El péptido aislado se puede acetilar en el aminoácido alfa N-terminal. El péptido aislado consiste en al menos diez residuos de aminoácidos contiguos y preferiblemente es un péptido aislado compuesto de acetil-péptido 106 (SEQ ID NO: 106).

- 35 En una realización adicional, el péptido consiste en al menos cuatro residuos de aminoácidos contiguos o el péptido consiste en al menos seis residuos de aminoácidos contiguos.

El péptido puede amidarse con amoníaco en el aminoácido alfa C-terminal.

- 40 El péptido aislado puede comprender además una secuencia de aminoácidos de (a) descrita anteriormente, (a) una secuencia de aminoácidos que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de una secuencia de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1); en donde el aminoácido N-terminal de la secuencia de aminoácidos de (a) se selecciona de la posición de aminoácido 2 a 21 de la secuencia de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO. 1). Este péptido puede amidarse opcionalmente con amoníaco en el aminoácido alfa C-terminal.

- 45 Los péptidos aislados como se describen en este documento, o los péptidos que se definen en el primer aspecto pueden tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a) que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de una secuencia de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID. NO: 1). Estos péptidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 244, 247, 248, 249, 250, 251 y 252. Estos péptidos se pueden acetilar adicionalmente en el aminoácido alfa N-terminal o miristoilado en el aminoácido alfa N-terminal y, opcionalmente, amidarse con amoníaco en el aminoácido alfa C-terminal. La secuencia de aminoácidos de (c) sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a) se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251 y 252. En el presente documento también se describe una composición que comprende un péptido aislado como se describe en los párrafos anteriores y descrito en el presente documento y un excipiente, y una composición farmacéutica que comprende un péptido aislado y un péptido aislado como se describe en los párrafos anteriores y descritos en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede además ser preferiblemente estéril, esterilizable o esterilizada. Estos péptidos pueden estar contenidos en un kit con reactivos útiles para la administración.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B ilustran que la fosforilación dependiente de PKC libera MARCKS de la membrana plasmática al citoplasma.

Las Figuras 2A-2C muestran que PKG induce la desfosforilación de MARCKS activando PP2A.

5 La Figura 3 muestra gráficos de barras que demuestran que PP2A es un componente esencial de la vía secretora de mucina.

La Figura 4 es un gel que ilustra que MARCKS se asocia con actina y miosina en el citoplasma.

La Figura 5 representa un mecanismo de señalización que controla la secreción de MPO en neutrófilos.

10 La Figura 6 es un gráfico de barras que representa la capacidad del péptido MANS para bloquear la secreción de mieloperoxidasa de neutrófilos caninos aislados.

La Figura 7 es un gráfico de barras que representa la capacidad del péptido MANS para bloquear la secreción de mieloperoxidasa de neutrófilos humanos aislados.

15 La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra que la PMA estimula un pequeño aumento en la secreción de MPO de los neutrófilos humanos estimulados con LPS, que se potencia de manera dependiente de la concentración mediante la coestimulación con 8-Br-cGMP.

La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra que la simulación de 8-Br-cGMP tiene poco efecto sobre la secreción de MPO de los neutrófilos humanos estimulados con LPS hasta que se produce una coestimulación con PMA de una manera dependiente de la concentración.

20 La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra que la PMA estimula un pequeño aumento en la secreción de MPO de los neutrófilos caninos estimulados con LPS que se potencia de manera dependiente de la concentración mediante la coestimulación con 8-Br-cGMP.

La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra que la simulación de 8-Br-cGMP tiene poco efecto sobre la secreción de MPO de los neutrófilos caninos estimulados con LPS hasta que se produce una coestimulación con PMA de una manera dependiente de la concentración.

25 La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra que la coestimulación con PMA+8-Br-cGMP es necesaria para la máxima secreción de MPO de los neutrófilos caninos estimulados con LPS.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se describirá ahora más detalladamente a continuación con referencia a las figuras adjuntas, en las que se ilustran realizaciones preferidas de la invención. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. El uso de las palabras "un" o "una" en este documento para describir cualquier aspecto de la presente invención debe interpretarse como un indicador de uno o más.

35 En este documento se describe un método para inhibir la liberación exocitótica de al menos un mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria que comprende poner en contacto al menos una célula inflamatoria, célula que comprende al menos un mediador inflamatorio contenido dentro de una vesícula dentro de la célula, con al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido MANS y un fragmento activo del mismo en una cantidad efectiva para reducir la liberación del mediador inflamatorio de la célula inflamatoria en comparación con la liberación del mediador inflamatorio del mismo tipo de célula inflamatoria que se produciría en ausencia de al menos un péptido.

40 En el presente documento también se describe un método para inhibir la liberación de al menos un mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria en un tejido o fluido de un sujeto que comprende la administración al tejido y/o fluido del sujeto, que comprende al menos una célula inflamatoria que comprende al menos un mediador inflamatorio contenido dentro de una vesícula dentro de la célula, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido MANS y un fragmento activo del mismo en una cantidad terapéuticamente efectiva para reducir la liberación de al menos un mediador inflamatorio de al menos una célula inflamatoria en comparación con la liberación del mediador inflamatorio de al menos uno del mismo tipo de célula inflamatoria que se produciría en ausencia de al menos un péptido. Más específicamente, reducir la liberación de un mediador inflamatorio comprende bloquear o inhibir el mecanismo que libera un mediador inflamatorio de la célula inflamatoria.

50 En el presente documento también se describe el contacto y/o la administración del péptido descrito anteriormente y a lo largo de la especificación con cualquier célula inflamatoria conocida que pueda estar contenida en el tejido o fluido de un sujeto que contenga al menos un mediador inflamatorio contenido dentro de una vesícula dentro de la célula. La célula inflamatoria es preferiblemente un leucocito, más preferiblemente un granulocito, que puede clasificarse adicionalmente

como un neutrófilo, un basófilo, un eosinófilo o una combinación de los mismos. Las células inflamatorias contactadas en el presente método también pueden ser un monocito/macrófago.

5 En el presente documento también se describe la reducción de la liberación de mediadores inflamatorios contenidos en las vesículas de células inflamatorias y estos mediadores inflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), eosinófilo peroxidasa (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima, histamina, proteoglicano, proteasa, un factor quimiotáctico, citoquina, un metabolito del ácido araquidónico, defensina, proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, fosfolipasa A<sub>2</sub>, condroitina-4-sulfato, proteinasa 3, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, receptor del complemento, receptor N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP), receptor de laminina, citocromo b<sub>558</sub>, factor  
10 quimocito-monocito, histaminasa, proteína de unión de vitamina B12, gelatinasa, activador de plasminógeno, beta-D-glucuronidasa, y una combinación de los mismos. Preferiblemente, estos mediadores inflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), eosinófilo peroxidasa (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima y una combinación de los mismos.

15 En uso, la presente invención contacta una cantidad efectiva del péptido como se define en el primer aspecto con una célula inflamatoria, en donde la cantidad efectiva se puede definir como una cantidad inhibidora de la desgranulación del péptido que reduce la cantidad de un mediador inflamatorio liberado de al menos una célula inflamatoria de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en comparación con la cantidad liberada de al menos una célula inflamatoria en ausencia del péptido. Esta cantidad también se conoce como una cantidad reductora de la liberación del  
20 mediador inflamatorio eficaz. Más preferiblemente, esta cantidad efectiva del péptido contactado comprende una cantidad inhibidora de la desgranulación del péptido que reduce la cantidad de un mediador inflamatorio liberado de al menos una célula inflamatoria de entre aproximadamente el 5-50% a aproximadamente el 99% en comparación con la cantidad liberado de al menos una célula inflamatoria en ausencia del péptido.

25 En el presente documento se describe la administración de al menos un péptido como se describe en el presente documento y un fragmento activo del mismo en una cantidad terapéuticamente eficaz en un tejido o fluido de un sujeto en donde el sujeto está afligido por una enfermedad respiratoria, que es preferiblemente asma, bronquitis crónica o EPOC. El sujeto puede estar afectado por una enfermedad intestinal, una enfermedad de la piel, una enfermedad autoinmune, un síndrome de dolor y combinaciones de los mismos. La enfermedad intestinal puede ser colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn o síndrome del intestino irritable. El sujeto puede padecer una enfermedad de la piel, como rosácea, eccema, psoriasis o acné severo. El sujeto también puede padecer artritis, como artritis reumatoide, artritis psoriásica, lupus  
30 eritematoso sistémico. Los sujetos afectados por fibrosis quística también pueden tratarse mediante el presente método y los péptidos. El presente método es preferiblemente útil para el tratamiento de sujetos, tales como mamíferos, y preferiblemente humanos, caninos, equinos y felinos.

35 El método descrito para el tratamiento de sujetos se realiza mediante la administración de uno o más péptidos que incluyen el péptido MANS o un fragmento o péptido activo descrito en el presente documento para incluir la administración tópica, la administración parenteral, la administración rectal, la administración pulmonar, la administración nasal o la administración oral. Más específicamente, la administración pulmonar se selecciona del grupo de aerosol, inhalador de polvo seco, inhalador de dosis medida y nebulizador. Además, el método descrito puede comprender además la administración al sujeto de una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un compuesto antiviral, un compuesto antiparasitario, un compuesto antiinflamatorio y un inmunomodulador.

40 Un método para administrar una composición farmacéutica también se describe en el presente documento. La composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto conocido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se usa en este documento es una cantidad de un compuesto que es suficiente para mejorar los síntomas exhibidos por un sujeto. La cantidad terapéuticamente efectiva variará con la edad y la condición física del paciente, la gravedad de la condición del paciente que se está tratando,  
45 la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente, el vehículo farmacéuticamente aceptable utilizado y factores similares dentro del mismo dentro del conocimiento y experiencia de los expertos en la materia. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferiblemente formas de dosificación sólidas tales como comprimidos o cápsulas. Las preparaciones líquidas para administración oral también pueden usarse y pueden prepararse en forma de jarabes o suspensiones, por ejemplo, soluciones que contienen un ingrediente activo, azúcar y una mezcla de etanol, agua, glicerol y propilenglicol. Si se desea, dichas preparaciones líquidas pueden incluir uno o más de los siguientes:  
50 agentes colorantes, agentes saborizantes y sacarina. Además, también pueden usarse agentes espesantes tales como carboximetilcelulosa, así como otros vehículos aceptables, cuya selección se conoce en la técnica.

55 Como se indicó anteriormente, se describen métodos para regular los procesos secretores celulares, especialmente aquellos que liberan mediadores inflamatorios de las células inflamatorias. Como se usa en el presente documento, el término "regular" significa bloquear, inhibir, disminuir, reducir, aumentar, potenciar o estimular. Una serie de procesos secretores celulares implican la liberación de contenidos de vesículas o gránulos unidos a la membrana dentro de las células. Una vesícula o gránulo unido a membrana se define como una partícula intracelular, que es principalmente vesicular (o una vesícula dentro de una célula) y que contiene material almacenado que puede ser secretado. Se ha encontrado que algunos de los contenidos de estas vesículas, como los que se encuentran en las células inflamatorias,  
60 son responsables de una variedad de patologías en numerosos tejidos de mamíferos. Algunos de los efectos de estas secreciones parecen incluir daño de tejido previamente sano durante la inflamación.

Esta invención proporciona un medio para bloquear la secreción de cualquier vesícula unida a la membrana, incluidas las que se encuentran en las células inflamatorias, dirigiéndose a una molécula específica importante en la vía de secreción intracelular con un péptido sintético. Este enfoque puede ser de importancia terapéutica para el tratamiento de una amplia variedad de afecciones hipersecretoras e inflamatorias en humanos y animales.

5 Más específicamente, la presente invención se dirige a las células inflamatorias que contienen los mediadores inflamatorios en uno o más gránulos o vesículas dentro del citoplasma de las células. Las células se ponen en contacto con uno o más péptidos que se seleccionan del péptido MANS o un fragmento activo del mismo, todos los cuales se describen con detalle en el presente documento. Preferiblemente, el contacto del péptido con la célula inflamatoria se realiza mediante administración a un sujeto afectado por o que padece una enfermedad en donde estas células inflamatorias están presentes en un tejido o fluido específico dentro del tejido. Tras la administración o el contacto del péptido con la célula, el péptido compite competitivamente por e inhibe competitivamente la unión de la proteína MARCKS nativa a la membrana de los gránulos o vesículas intracelulares que contienen los mediadores inflamatorios. Como resultado del bloqueo de la unión de la proteína MARCKS a las vesículas en las células inflamatorias, estas vesículas en estas células no se mueven a la membrana plasmática de las células como lo harían normalmente cuando se las estimula para liberar exocitéticamente su contenido de mediadores inflamatorios. de las células. Por lo tanto, los péptidos descritos en el presente documento que incluyen los péptidos como se definen en el primer aspecto inhiben el movimiento de las vesículas a la membrana plasmática de las células, lo que, a su vez, reduce la liberación de los mediadores inflamatorios de las células inflamatorias. La cantidad de mediadores inflamatorios liberados de las células a lo largo del tiempo se reduce debido a que tanto la velocidad de liberación como la cantidad de liberación de los mediadores de las células inflamatorias dependen de la concentración del péptido administrado y en contacto con las células inflamatorias.

Un beneficio de la presente invención es que puede combinar una terapia que incluye el bloqueo directo de la secreción de moco con una terapia antiinflamatoria única. Un beneficio de la presente invención sobre las terapias antiinflamatorias actuales que afectan a una supresión general del sistema inmune es que se cree que el péptido bloquea la secreción de solo componentes intracelulares secretados por las células inflamatorias. Por lo tanto, muchos aspectos del sistema inmunológico deberían funcionar incluso con la inhibición de los mediadores inflamatorios.

Los péptidos como se definen en el primer aspecto pueden regular, es decir, bloquear, la liberación de mediador inflamatorio de las células. Esta inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios es un medio atractivo para prevenir y tratar una variedad de trastornos, por ejemplo, enfermedades y afecciones patológicas que implican inflamación. Por lo tanto, los péptidos pueden ser útiles para el tratamiento de tales condiciones. Estos abarcan el síndrome de dificultad respiratoria del adulto o lesión térmica de fase aguda. Otras enfermedades y afecciones patológicas que implican una inflamación en las que los péptidos si el tratamiento de los cuales los péptidos de la invención pueden ser útiles, pero no están abarcados por la presente invención incluyen enfermedades de las vías respiratorias y enfermedades inflamatorias crónicas que incluyen, entre otras, osteoartritis, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis, enfermedad de injerto contra huésped y lupus eritematoso sistémico. Los péptidos también se pueden usar para tratar otros trastornos asociados con la actividad de niveles elevados de mediadores proinflamatorios y enzimas, como las respuestas a diversos agentes infecciosos y varias enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el síndrome de choque tóxico, la diabetes y las enfermedades inflamatorias del intestino.

Los usos del péptido y los métodos descritos en el presente documento incluyen terapias para combatir la inflamación junto con terapias que combinarán la actividad antiinflamatoria del péptido con su capacidad para bloquear la secreción de moco. Las enfermedades que pueden tratarse con la capacidad del péptido para bloquear tanto la inflamación como la secreción de moco incluyen, entre otras, enfermedades inflamatorias del intestino, trastornos digestivos (es decir, vesícula biliar inflamada, enfermedad de Menetier) y enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias.

Otros mediadores proinflamatorios se han correlacionado con una variedad de estados de enfermedad que se correlacionan con la afluencia de neutrófilos en sitios de inflamación o lesión. Se ha demostrado que los anticuerpos bloqueadores son terapias útiles contra la lesión tisular asociada a los neutrófilos en la inflamación aguda (Harada et al., 1996, Molecular Medicine Today 2, 482). Las células distintas de los neutrófilos que pueden liberar mediadores inflamatorios incluyen otros leucocitos, como los basófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos, y las terapias pueden dirigirse contra la secreción de estas células. Neutrófilos, eosinófilos y basófilos son cada uno un tipo de granulocito, es decir, un leucocito que tiene gránulos en su citoplasma. Los leucocitos sintetizan una serie de mediadores inflamatorios que se empaquetan y almacenan en gránulos citoplasmáticos. Entre estos mediadores se encuentran, por ejemplo, la mieloperoxidasa [MPO] en los neutrófilos (Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood 1997; 89: 3503-3521), eosinófilo peroxidasa [EPO] y principal proteína básica [MBP] en eosinófilos (Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 651-663), lisozima en monocitos/macrófagos (Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Strube M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. J Leukoc Biol 1992; 52: 173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. J Immunol 2003; 170: 5276-5280), y granzima en células asesinas naturales (NK) y linfocitos citotóxicos (Bochan MR, Goebel WS, Brahmi Z. Stably transfected antisense granzyme B and perforin constructs inhibit human granule-mediated lytic ability. Cell Immunol 1995; 164: 234-239; Gong J H., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia 1994; 8: 652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92.. J Hematother Stem Cell Res 2001; 10: 369-383; y Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte

5 activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104: 183-1907-10). Estos mediadores pueden liberarse en los sitios de lesión y pueden contribuir a la inflamación y reparación, como en el pulmón y en otros lugares, como resultado de la infiltración de estas células en el sitio del tejido de la lesión o enfermedad. Los leucocitos liberan estos gránulos mediante un mecanismo exocítico (Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003; 83: 581-632; Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 923-932).

10 Los mastocitos, que generalmente no circulan en el torrente sanguíneo, y los basófilos contienen gránulos citoplásmicos secretores que almacenan y pueden liberar, tras la activación celular, mediadores inflamatorios (anafilácticos) preformados, como la histamina; proteoglicanos, tales como heparina y condroitina sulfato; proteasas tales como triptasa, quimasa, carboxipeptidasa y proteasa de tipo catepsina G; factores quimiotácticos, citoquinas y metabolitos del ácido araquidónico que actúan sobre la vasculatura, el músculo liso, el tejido conjuntivo, las glándulas mucosas y las células inflamatorias.

15 Los neutrófilos, también conocidos como leucocitos polimorfonucleares (PMN), comprenden 50 a 60% del total de leucocitos circulantes. Los neutrófilos actúan contra agentes infecciosos, como bacterias, hongos, protozoos, virus, células infectadas por virus, así como células tumorales, que penetran las barreras físicas del cuerpo en los sitios de infección o lesión. Los neutrófilos maduran en seis etapas morfológicas: mieloblasto, promieloblasto, mielocito, metamielocito, neutrófilo no segmentado (banda) y neutrófilo segmentado (funcionalmente activo). En los neutrófilos, los mediadores inflamatorios se almacenan en gránulos primarios (azurófilo), secundarios (específicos) y terciarios (gelatinasa), así como en vesículas secretoras. Entre los numerosos mediadores de la inflamación, los gránulos primarios (azurófilos) contienen mieloperoxidasa (MPO), lisozima, defensinas, proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, fosfolipasa A<sub>2</sub>, condroitina-4-sulfato y proteinasa 3 (véase, por ejemplo, Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 1992; 356: 618-622); los gránulos secundarios (específicos) contienen lisozima, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, fosfolipasa A<sub>2</sub>, receptores del complemento, por ejemplo, CR3, CR4, receptores N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP), receptores de laminina, citocromo b<sub>558</sub>, factor monocito-quimiotáctico, histaminasa y proteína de unión a la vitamina B12; y los gránulos de almacenamiento pequeños contienen gelatinasa, activador de plasminógeno, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa y citocromo b<sub>558</sub>. Los gránulos de neutrófilos contienen sustancias antimicrobianas o citotóxicas, proteinasas neutras, hidrolasas ácidas y un conjunto de receptores de membrana citoplásmicos. Entre los constituyentes de los gránulos de azurófilo, la mieloperoxidasa (MPO) es una enzima crítica en la conversión de peróxido de hidrógeno en ácido hipocloroso. Junto con el peróxido de hidrógeno y un cofactor de haluro, forma un eficaz mecanismo microbicida y citotóxico de los leucocitos - el sistema de mieloperoxidasa-.

35 Las defensinas, que constituyen del 30 al 50% de la proteína granulada azurófila, son péptidos antimicrobianos potentes (peso molecular <4000) pequeños que son citotóxicos para una amplia gama de bacterias, hongos y algunos virus. Su toxicidad puede deberse a la permeabilización de la membrana de la célula diana que es similar a otras proteínas formadoras de canales (porforinas). La proteína que aumenta la permeabilidad bacteriana (BPI) es un miembro de las porforinas. Es altamente tóxico para las bacterias gramnegativas, pero no para las bacterias u hongos grampositivos, y también puede neutralizar la endotoxina, el componente lipopolisacárido tóxico de la envoltura de las células bacterianas gramnegativas.

40 La lactoferrina secuestra hierro libre, impidiendo así el crecimiento de microorganismos ingeridos que sobreviven al proceso de destrucción y aumentan la permeabilidad bacteriana a la lisozima.

45 Las proteasas de serina como la elastasa y la catepsina G hidrolizan las proteínas en envolturas de células bacterianas. Los sustratos de la elastasa de granulocitos incluyen enlaces cruzados de colágeno y proteoglicanos, así como componentes de elastina de los vasos sanguíneos, ligamentos y cartílago. La catepsina D escinde los proteoglicanos del cartílago, mientras que las colagenasas de granulocitos son activas en la escisión del tipo I y, en menor grado, del colágeno tipo III del hueso, cartílago y tendón. Los productos de descomposición del colágeno tienen actividad quimiotáctica para los neutrófilos, los monocitos y los fibroblastos.

50 La regulación del potencial destructivo tisular de las proteasas lisosomales está mediada por inhibidores de la proteasa tales como alfa2-macroglobulina y alfa1-antiproteasa. Estas antiproteasas están presentes en el suero y fluidos sinoviales. Pueden funcionar uniéndose y cubriendo los sitios activos de las proteasas. El desequilibrio proteasa-antiproteasa puede ser importante en la patogenia del enfisema.

55 Los gránulos de azurófilo funcionan predominantemente en el medio intracelular (en la vacuola fagolisosómica), donde participan en la destrucción y degradación de microorganismos. Los gránulos específicos de neutrófilos son susceptibles de liberar sus contenidos extracelularmente y tienen un papel importante en el inicio de la inflamación. Los gránulos específicos representan un depósito intracelular de varios componentes de la membrana plasmática, incluido el citocromo b (componente de la NADPH oxidasa, una enzima responsable de la producción de superóxido), receptores para el fragmento del complemento iC3b (CR3, CR4), para la laminina y para laminina, y formilmetionil-péptido quimioatrayentes. Además de otras, hay histaminasa que es relevante para la degradación de la histamina, la proteína de unión a la vitamina y el activador del plasminógeno que es responsable de la formación de plasmina y la escisión de C5a a partir de C5. La importancia de los gránulos de neutrófilos en la inflamación es evidente a partir de estudios de varios pacientes con

anomalías congénitas de los gránulos. Los pacientes con síndrome de Chédiak-Higashi presentan una anomalía profunda en la tasa de establecimiento de una respuesta inflamatoria y presentan gránulos lisosomales anormalmente grandes. El síndrome congénito de deficiencia específica de gránulos es un trastorno extremadamente raro caracterizado por respuestas inflamatorias disminuidas e infecciones bacterianas graves de la piel y tejidos profundos.

5 Aunque los mecanismos que regulan la secreción exocitótica de estos gránulos solo se entienden parcialmente, se identificaron varias moléculas clave en el proceso, incluidos los transitorios de  $Ca^{2+}$  intracelulares (Richter et al., Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 9472-9476; Blackwood et al., Biochem J 1990; 266: 195-200), proteínas G, tirosina y proteína quinasas (PK, especialmente PKC) (Smolen et al., Biochim Biophys Acta 1990; 1052: 133-142; Niessen et al., Biochim. Biophys. Acta 1994; 1223: 267-273; Naucner et al., Pettersen et al., Chest 2002; 121: 142-150), Rac2 (Abdel-Latif et al., Blood 2004; 104: 832-839; Lacy et al., J Immunol 2003; 170: 2670-2679) y diversos SNARE, SNAP y VAMP (Sollner et al., Nature 1993; 362: 318-324; Lacy, Pharmacol Ther 2005; 107: 358-376). Las proteínas SNARE (receptor de proteína de fijación de N-etilmaleimida soluble) son una familia de proteínas asociadas a la membrana caracterizadas por un dominio de bobina enrollada alfa-helicoidal llamado el motivo SNARE (Li et al., Cell. Mol. Life Sci. 60: 942-960 (2003)). Estas proteínas se clasifican como v-SNAREs y t-SNARE en función de su localización en la vesícula o membrana objetivo; otro esquema de clasificación define R-SNAREs y Q-SNARE, según el residuo de arginina o glutamina conservado en el centro del motivo SNARE. Los SNARE se localizan en distintos compartimentos de membrana de las vías de tráfico de secreciones y secretoras, y contribuyen a la especificidad de los procesos de fusión de membrana intracelular. El dominio t-SNARE consiste en un paquete de 4 hélices con un giro de bobina enrollada. El motivo SNARE contribuye a la fusión de dos membranas. Los motivos SNARE se dividen en cuatro clases: homólogos de sintaxina 1a (t-SNARE), VAMP-2 (v-SNARE) y los motivos SNARE N y C terminales de SNAP-25. Un miembro de cada clase puede interactuar para formar un complejo SNARE. El motivo SNARE se encuentra en los dominios N-terminales de ciertos miembros de la familia de sintaxinas, como la sintaxina 1a, que se requiere para la liberación de neurotransmisores (Lerman et al., Biochemistry 39: 8470-8479 (2000)), y la sintaxina 6, que se halla en las vesículas de transporte endosomal (Misura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 9184-9189 (2002)). Las proteínas SNAP-25 (proteína asociada a un sinaptosoma de 25 kDa) son componentes de los complejos SNARE, que pueden explicar la especificidad de la fusión de la membrana y ejecutar la fusión directamente mediante la formación de un complejo ajustado (el complejo SNARE o núcleo) que tunen la vesícula sináptica y las membranas plasmáticas. Las SNAREs constituyen una gran familia de proteínas que se caracterizan por secuencias de 60 residuos conocidas como motivos SNARE, que tienen una alta propensión a formar bobinas enrolladas y, a menudo, preceden a las regiones transmembrana carboxi-terminales. El complejo del núcleo sináptico está formado por cuatro motivos SNARE (dos de SNAP-25 y uno de cada uno de sinaptobrevina y sintaxina 1) que no están estructurados de forma aislada, pero forman un haz paralelo de cuatro hélices en el ensamblaje. La estructura cristalina del complejo del núcleo ha revelado que el haz helicoidal está altamente torcido y contiene varios puentes salinos en la superficie, así como capas de residuos hidrófobos interiores. Una capa polar en el centro del complejo está formada por tres glutaminas (dos de SNAP-25 y una de sintaxina 1) y una arginina (de sinaptobrevina) (Rizo et al., Nat Rev Neurosci 3: 641-653 (2002)). Los miembros de la familia SNAP-25 contienen un grupo de residuos de cisteína que pueden ser palmitoilados para la unión a la membrana (Risinger et al., J. Biol. Chem. 268: 24408-24414 (1993)). El papel principal de los neutrófilos es fagocitar y destruir agentes infecciosos. También limitan el crecimiento de algunos microbios, antes de la aparición de respuestas inmunológicas adaptativas (específicas). Aunque los neutrófilos son esenciales para la defensa del huésped, también se han implicado en la patología de muchas afecciones inflamatorias crónicas y en la lesión por isquemia-reperusión. Las enzimas hidrolíticas de origen neutrófilo y los inhibidores de la proteasa inactivados por oxidación se pueden detectar en el líquido aislado de los sitios inflamatorios. En condiciones normales, los neutrófilos pueden migrar a sitios de infección sin dañar los tejidos del huésped. Sin embargo, a veces puede ocurrir un daño no deseado a un tejido huésped. Este daño puede ocurrir a través de varios mecanismos independientes. Estos incluyen la activación prematura durante la migración, la liberación extracelular de productos tóxicos durante la destrucción de algunos microbios, la eliminación de células hospedadoras infectadas o dañadas y los desechos como un primer paso en la remodelación de tejidos, o la incapacidad de terminar las respuestas inflamatorias agudas. La lesión por isquemia-reperusión se asocia con una afluencia de neutrófilos en el tejido afectado y su posterior activación. Esto puede ser desencadenado por sustancias liberadas de células hospedadoras dañadas o como consecuencia de la generación de superóxido a través de la xantina oxidasa.

50 En condiciones normales, la sangre puede contener una mezcla de neutrófilos normales, cebados, activados y agotados. En un sitio inflamatorio, se encuentran principalmente neutrófilos activados y agotados. Los neutrófilos activados han mejorado la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI). Se ha detectado una subpoblación de neutrófilos con la explosión respiratoria mejorada en la sangre de personas con una infección bacteriana aguda y pacientes con el síndrome de dificultad respiratoria en adultos (SDRA). Este es un ejemplo de una paradoja de neutrófilos. Los neutrófilos se han implicado en la patología de esta afección debido a la gran afluencia de estas células al pulmón y al daño tisular asociado causado por los oxidantes y las enzimas hidrolíticas liberadas por los neutrófilos activados. El deterioro de la actividad microbicida de los neutrófilos que se produce a medida que empeora el SDRA puede ser una respuesta protectora por parte del huésped, que es inducida localmente por productos inflamatorios.

60 La fase aguda de la lesión térmica también está asociada con la activación de los neutrófilos, y esto es seguido por un deterioro general en diversas funciones de los neutrófilos. La activación de los neutrófilos por complejos inmunes en el líquido sinovial contribuye a la patología de la artritis reumatoide. La activación crónica de los neutrófilos también puede iniciar el desarrollo del tumor porque algunas ROI generadas por los neutrófilos dañan el ADN y las proteasas promueven la migración de las células tumorales. En pacientes que sufren quemaduras graves, se ha establecido una correlación

entre el inicio de la infección bacteriana y la reducción de la proporción y el número absoluto de neutrófilos positivos para los receptores de anticuerpos y del complemento. También se ha demostrado que los oxidantes de origen neutrófilo oxidan las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que luego se unen de manera más efectiva a la membrana plasmática de los macrófagos a través de receptores de depuración específicos. La captación de estas LDL oxidadas por los macrófagos puede iniciar la aterosclerosis. Además, se han encontrado neutrófilos cebados en personas con hipertensión esencial, enfermedad de Hodgkin, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, sarcoidosis y septicemia, donde el cebado se correlaciona con altas concentraciones de TNF-alfa circulante (caquectina). El daño hidrolítico al tejido del hospedador y, por lo tanto, las condiciones inflamatorias crónicas pueden ocurrir cuando las pantallas de antioxidantes y antiproteasas se ven superadas. Se cree que la deficiencia de antiproteasa es responsable de la patología del enfisema. Muchas antiproteasas son miembros de la familia de los inhibidores de la serina proteasa (SERPIN). Aunque la circulación es rica en antiproteasas, estas proteínas grandes pueden ser excluidas selectivamente en los sitios de inflamación porque los neutrófilos se adhieren a sus objetivos. El estrés oxidativo puede iniciar el daño tisular al reducir la concentración de antiproteasas extracelulares por debajo del nivel requerido para inhibir las proteasas liberadas. Los oxidantes clorados y el peróxido de hidrógeno pueden inactivar las antiproteasas como el inhibidor de la proteasa alfa1 y la macroglobulina alfa2, que son inhibidores endógenos de la elastasa, pero a la vez activan las metaloproteasas latentes como las colagenasas y la gelatinasa, que contribuyen a la inactivación adicional de las antiproteasas.

Los constituyentes citoplasmáticos de los neutrófilos también pueden ser la causa de la formación de anticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilos específicos (ANCA), que están estrechamente relacionados con el desarrollo de vasculitis sistémica y glomerulonefritis. Los ANCA son anticuerpos dirigidos contra las enzimas que se encuentran principalmente en el azurófilo o en los gránulos primarios de los neutrófilos. Hay tres tipos de ANCA que pueden distinguirse por los patrones que producen por inmunofluorescencia indirecta en neutrófilos normales fijados en etanol. La fluorescencia citoplásmica granular fina difusa (cANCA) se encuentra típicamente en la granulomatosis de Wegener, en algunos casos de poliarteritis microscópica y síndrome de Churg Strauss, y en algunos casos de glomerulonefritis necrotizante segmentaria y crescénica. El antígeno diana suele ser la proteinasa 3. La fluorescencia perinuclear (pANCA) se encuentra en muchos casos de poliarteritis microscópica y glomerulonefritis. Estos anticuerpos a menudo se dirigen contra la mieloperoxidasa, pero otros objetivos incluyen elastasa, catepsina G, lactoferrina, lisozima y beta-D-glucuronidasa. El tercer grupo designado ANCA "atípico" incluye fluorescencia nuclear de neutrófilos y algunos patrones citoplásmicos inusuales y mientras que algunos de los antígenos diana se comparten con pANCA, los otros aún no se han identificado. Los pANCA también se encuentran en un tercio de los pacientes con enfermedad de Crohn. La incidencia informada de ANCA en la artritis reumatoide y el LES varía considerablemente, pero los patrones son predominantemente pANCA y ANCA atípico.

El eosinófilo es un leucocito de etapa final terminalmente diferenciado que reside predominantemente en el tejido submucoso y es reclutado en sitios de reacciones inmunitarias específicas, incluidas las enfermedades alérgicas. El citoplasma de eosinófilos contiene gránulos elipsoidales grandes con un núcleo cristalino denso en electrones y una matriz parcialmente permeable. Además de estos gránulos cristaloides primarios grandes, hay otro tipo de gránulo que es más pequeño (gránulo pequeño) y carece del núcleo cristalino. Los grandes gránulos específicos de eosinófilos contienen al menos cuatro proteínas catiónicas distintas, que ejercen una serie de efectos biológicos sobre las células huésped y las dianas microbianas: principal proteína básica (MBP), proteína catiónica eosinófila (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), y eosinófilo peroxidasa (EPO). Los basófilos contienen aproximadamente una cuarta parte de la proteína básica principal que los eosinófilos junto con cantidades detectables de EDN, ECP y EPO. También se encuentran pequeñas cantidades de EDN y ECP en los neutrófilos (Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651-663). La MBP parece carecer de actividad enzimática, pero es un polipéptido altamente catiónico que puede ejercer sus actividades tóxicas por las interacciones con las membranas lipídicas que conducen a su trastorno. Tanto la MBP como la EPO pueden actuar como inhibidores alostéricos selectivos de la unión del agonista a los receptores muscarínicos M2. Estas proteínas pueden contribuir a la disfunción del receptor M2 y mejorar la broncoconstricción mediada por vía vaginal en el asma. EDN puede dañar específicamente la capa de mielina de las neuronas. La histaminasa y una variedad de enzimas lisosomales hidrolíticas también están presentes en los gránulos específicos grandes de eosinófilos. Entre las enzimas en pequeños gránulos de eosinófilos están la arilsulfatasa, la fosfatasa ácida y una metaloproteínasa de 92 kDa, una gelatinasa. Los eosinófilos pueden elaborar citoquinas que incluyen aquellas con posibles actividades del factor de crecimiento autocrino para los eosinófilos y aquellas con roles potenciales en las respuestas inflamatorias agudas y crónicas. Tres citoquinas tienen actividades de factor de crecimiento para eosinófilos: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-3 e IL-5. Otras citoquinas producidas por eosinófilos humanos que pueden tener actividades en respuestas inflamatorias agudas y crónicas incluyen IL-1-alfa, IL-6, IL-8, TNF-alfa y ambos factores de crecimiento transformantes, TGF-alfa y TGF-beta.

Los eosinófilos contienen gránulos cristaloides que contienen MBP, proteína catiónica eosinófila, EPO y neurotoxina derivada de eosinófilos (Gleich, *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651-663). La línea celular promielocítica humana HL-60 clon 15 puede usarse para examinar la secreción de EPO. Esta línea celular se estableció a partir de un clon de HL-60 que se había cultivado a un pH elevado durante dos meses (Fischkoff, *Leuk Res* 1988; 12: 679-686) y luego se trató con ácido butírico para permitir que las células se diferencien. Para exhibir muchas de las características de los eosinófilos de sangre periférica, incluida la expresión de proteínas granulares específicas de eosinófilos (Rosenberg et al., *J Exp Med* 1989; 170: 163-176; Tiffany et al., *J Leukoc Biol* 1995; 58: 49-54; Badewa et al., *Exp. Biol Med* 2002; 227: 645-651). Los eosinófilos pueden participar en reacciones de hipersensibilidad, especialmente a través de dos mediadores inflamatorios de lípidos, leucotrieno C<sup>4</sup> (LTC<sup>4</sup>) y factor de activación plaquetaria (PAF). Ambos mediadores contraen el músculo liso de

las vías respiratorias, promueven la secreción de moco, alteran la permeabilidad vascular y provocan la infiltración de eosinófilos y neutrófilos. Además de las actividades directas de estos mediadores derivados de eosinófilos, la MBP puede estimular la liberación de histamina de los basófilos y los mastocitos, y la MBP puede estimular la liberación de EPO de los mastocitos. Los eosinófilos pueden servir como una fuente local de mediadores lipídicos específicos, así como inducir la liberación de mediadores de mastocitos y basófilos. El contenido de gránulos de eosinófilos se libera siguiendo estímulos similares a los gránulos de neutrófilos, por ejemplo, durante la fagocitosis de partículas opsonizadas y por factores quimiotácticos. Las enzimas lisosomales de los neutrófilos actúan principalmente sobre el material engullido en los fagolisosomas, mientras que el contenido de gránulos de eosinófilos actúa principalmente sobre la estructura diana extracelular, como parásitos y mediadores inflamatorios.

El desarrollo de monocitos y macrófagos tiene lugar en la médula ósea y pasa por los siguientes pasos: células madre; célula madre comprometida monoblasto promonocito monocitos en la médula ósea; monocito en sangre periférica; y macrófagos en los tejidos. La diferenciación de los monocitos en la médula ósea se produce rápidamente (1.5 a 3 días). Durante la diferenciación, los gránulos se forman en el citoplasma monocito y estos pueden dividirse como en los neutrófilos en al menos dos tipos. Sin embargo, son menos y más pequeños que sus homólogos de neutrófilos (azurófilo y gránulos específicos). Su contenido de enzimas es similar.

Las enzimas unidas a los gránulos de monocitos/macrófagos incluyen lisozima, fosfatasa ácida y beta-glucuronidasa. Como modelo para estudios in vivo, se utilizó la secreción de lisozima de las células U937. Esta línea celular se deriva de un linfoma histiocítico humano y se ha utilizado como una línea celular monocítica que puede ser activada por una variedad de agonistas, como PMA (Hoff et al., J Leukoc Biol 1992; 52: 173-182; Balboa et al., J Immunol 2003; 170: 5276-5280; Sundstrom et al., Int J Cancer 1976; 17: 565-577). Las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos citotóxicos contienen potentes gránulos citotóxicos que incluyen perforina, una proteína formadora de poros y granzimas, serina proteasas específicas de los linfocitos. Por ejemplo, la línea celular NK-92 es una línea humana dependiente de IL-2 establecida en un paciente con linfoma no Hodgkin rápidamente progresivo (Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia 1994; 8: 652-658). Las células NK-92 expresan altos niveles de moléculas involucradas en la ruta citolítica perforina-granzima que se dirige a una amplia gama de células malignas (Gong et al, vide infra, and Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92 J Hematother Stem Cell Res 2001; 10: 369-383). Las granzimas son serina proteasas exógenas que son liberadas por los gránulos citoplásmicos dentro de las células T citotóxicas y las células asesinas naturales. Las granzimas pueden inducir la apoptosis dentro de las células infectadas por virus, destruyéndolas.

La liberación extracelular de un mediador de la inflamación (mediador inflamatorio) de un granulocito (o leucocito), y la liberación extracelular de más de un mediador de la inflamación (mediador inflamatorio) de un granulocito (o leucocito) a veces se denomina aquí como desgranulación. En una realización preferida, la liberación de un mediador de la inflamación comprende la liberación de dicho mediador de un gránulo ubicado en el interior de un granulocito o leucocito. La liberación de mediador inflamatorio es preferiblemente la liberación de un mediador inflamatorio de estos gránulos.

Los neutrófilos y macrófagos, al cebarse con agentes proinflamatorios (estimulantes inflamatorios) como TNF $\alpha$ , aumentan dramáticamente su síntesis de proteína MARCKS: hasta el 90% de la nueva proteína formada por neutrófilos en respuesta a TNF $\alpha$  o lipopolisacárido (LPS) es MARCKS (Thelen M, Rosen A, Naim AC, Aderem A. Tumor necrosis factor alpha modifies agonist-dependent responses in human neutrophils by inducing the synthesis and myristoylation of a specific protein kinase C substrate. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 5603-5607). MARCKS puede tener un papel importante en la liberación posterior de mediadores inflamatorios cuando las células que contienen gránulos, como los neutrófilos y los macrófagos, son estimulados por agonistas, especialmente aquellos que funcionan activando la PKC (Burgoyne et al., Physiol Rev 2003; 83: 581-632; Logan et al., J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 923-932; Smolen et al., Biochim Biophys Acta 1990; 1052: 133-142; Niessen et al., Biochim. Biophys. Acta 1994; 1223: 267 -273; Naucler et al., J Leukoc Biol 2002; 71: 701-710).

La administración de una cantidad inhibitoria de la desgranulación del péptido MANS o un fragmento activo del mismo como se describe en el presente documento o un péptido como se define en el primer aspecto a un sitio de inflamación en un sujeto, cuyo sitio de inflamación ha resultado del inicio de la entrada de una enfermedad, una afección, un trauma, un cuerpo extraño o una combinación de los mismos en el sitio de la inflamación en el sujeto, puede reducir la cantidad de un mediador de la inflamación liberada por los leucocitos infiltrantes en el sitio de la inflamación, donde los leucocitos son preferiblemente granulocitos. La administración del péptido y/o al menos un fragmento activo del mismo puede reducir la cantidad de un mediador de la inflamación liberada por los leucocitos, como los granulocitos que se infiltran en el sitio de la inflamación. La cantidad inhibitoria de la desgranulación del péptido, o la cantidad inhibitoria de la desgranulación de un fragmento activo del mismo, es suficiente para reducir o inhibir la liberación excitotóxica de mediadores inflamatorios de los gránulos contenidos dentro de las células inflamatorias que se infiltran en el sitio. La eficacia inhibitoria de la desgranulación se mide en un momento después de la administración del péptido o su fragmento activo comparando el porcentaje de inhibición (es decir, el porcentaje de reducción) de la liberación de mediadores de la inflamación de dichas células (leucocitos o granulocitos u otras células inflamatorias) en relación con el nivel, la cantidad o la concentración de dichos mediadores de inflamación liberados o producidos aproximadamente al mismo tiempo en ausencia de péptido y/o en ausencia del fragmento activo del mismo. Además, un especialista clínico puede determinar si la inflamación en el sitio del tejido se ha reducido al medir los síntomas y los parámetros de inflamación conocidos como indicadores de la enfermedad para determinar si se ha administrado una cantidad suficiente o terapéuticamente eficaz del péptido y/o un

fragmento activo de la misma. Una cantidad suficiente de inhibición de la desgranulación es la cantidad que produce un porcentaje de reducción de un mediador de la inflamación liberada por un granulocito, en el lugar de la inflamación, cuyo porcentaje es de aproximadamente 1% a aproximadamente 99%, preferiblemente de 5% a aproximadamente 99%, más preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 99%, incluso más preferiblemente de aproximadamente 25% a 99%, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 50% a aproximadamente 99% de la cantidad de dicho mediador de inflamación liberada de dicho granulocito en la ausencia del péptido o un fragmento activo del mismo probado en las mismas condiciones.

La administración de una cantidad inhibidora de la desgranulación del péptido MANS como se describe en el presente documento o como se define en el primer aspecto a un sitio de estimulación inflamatoria en un animal, cuyo sitio de estimulación inflamatoria se ha creado mediante la administración de una cantidad estimulante de la inflamación de un estimulante inflamatorio a dicho sitio, se puede reducir la cantidad de un mediador de la inflamación liberada por un granulocito, estimulándose a ese granulocito mediante dicho estimulante inflamatorio en dicho sitio de estimulación inflamatoria, de aproximadamente 1% a aproximadamente 99%, preferiblemente de 5% a aproximadamente 99%, más preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 99%, incluso más preferiblemente de aproximadamente 25% a 99%, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 50% a aproximadamente 99% de la cantidad de dicho mediador de inflamación liberado de dicho granulocito en ausencia del péptido en presencia de la cantidad idéntica estimulante de la inflamación de dicho estimulante inflamatorio.

La administración de una cantidad inhibidora de la desgranulación del péptido MANS como se describe en el presente documento o un péptido como se define en el primer aspecto a un sitio de estimulación inflamatoria en un animal, cuyo sitio de estimulación inflamatoria se ha creado mediante la administración de una cantidad estimulante de la inflamación de un estimulante inflamatorio a dicho sitio, puede reducir la cantidad de un mediador de la inflamación liberada por un granulocito, estimulándose dicho granulocito por dicho estimulante inflamatorio en dicho sitio de estimulación inflamatoria, en un 100% de la cantidad de dicho mediador de la inflamación liberada por dicho granulocito en ausencia del péptido en presencia de la cantidad idéntica estimulante de la inflamación de dicho estimulante inflamatorio.

Un ejemplo de un estimulante inflamatorio usado en ejemplos in vitro en este documento es el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). La proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) es casi tan efectiva como C5a, y mucho más potente que la IL-8, en la desgranulación de los basófilos, lo que resulta en la liberación de histamina. La liberación de histamina puede ocurrir después de la estimulación con quimioquinas (es decir, citoquinas quimioatrayentes), RANTES y MIP-1. En relación con la concentración basal del péptido MARCKS presente en el sitio de estimulación inflamatoria, la cantidad inhibitoria de la desgranulación del péptido MANS como se describe aquí o péptido como se define en el primer aspecto administrado a un sitio de estimulación inflamatoria en un animal comprende aproximadamente 1 vez a aproximadamente 1 000 000 veces la concentración del péptido MARCKS en dicho sitio de estimulación inflamatoria, preferiblemente de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 100 000 veces la concentración del péptido MARCKS en dicho sitio de estimulación inflamatoria, más preferiblemente de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 10000 veces la concentración del péptido MARCKS en dicho sitio de estimulación inflamatoria, aún más preferiblemente de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 1000 veces la concentración del péptido MARCKS en dicho sitio de estimulación inflamatoria, aún más preferiblemente de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 100 veces la concentración del péptido MARCKS en dicho sitio de estimulación inflamatoria, y aún más preferiblemente de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 10 veces la concentración del péptido MARCKS en dicho sitio de estimulación inflamatoria.

El granulocito puede residir sobre o en las vías respiratorias de un animal, preferiblemente un humano, y el péptido MANS como se describe aquí o como se define en el primer aspecto puede administrarse por inhalación, tal como por inhalación de una composición farmacéutica que comprende el péptido, para por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende el péptido y una solución acuosa, cuya composición se administra en forma de aerosol, o una composición farmacéutica que comprende el péptido S en forma de polvo seco, cuya composición se administra utilizando un inhalador de polvo seco. Pueden ser útiles otros métodos y dispositivos conocidos en la técnica para la administración de una solución o polvo por inhalación, tales como, por ejemplo, gotitas, pulverizadores y nebulizadores.

Es posible que el péptido descrito aquí, o un péptido como se define en el primer aspecto, puedan bloquear los procesos secretorios que son fisiológicamente importantes, incluidas las funciones secretoras basales. Aunque los inventores no desean limitarse a ninguna teoría particular de la invención, se piensa que los mecanismos que regulan tal secreción basal son diferentes de los que regulan la secreción estimulada. Alternativamente, los mecanismos secretorios basales pueden requerir menos proteína MARCKS que la secreción estimulada. La secreción basal puede preservarse, ya que todas las terapias para bloquear la secreción mediada por MARCKS pueden no eliminar toda la función de MARCKS.

Como se usa en este documento, el término "secuencia de nucleótidos de MARCKS" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos derivada de un gen que codifica una proteína MARCKS, que incluye, por ejemplo, secuencia de ADN o ARN, secuencia de ADN del gen, cualquier secuencia de ARN transcrita, ARN secuencia del pre-ARNm o transcripción del ARNm, y ADN o ARN unido a la proteína.

La administración precisa del péptido bloqueador de MARCKS también puede superar cualquier limitación potencial del bloqueo de procesos secretorios importantes. La administración de dichos agentes al tracto respiratorio debe realizarse fácilmente con formulaciones inhaladas. Dado que estos agentes pueden ser útiles en el tratamiento de la enfermedad

inflamatoria intestinal, se puede imaginar la administración de los agentes bloqueadores en el recto/colon/tracto intestinal a través de un enema o supositorios. Las inyecciones intraarticulares o el suministro transdérmico en articulaciones inflamadas pueden brindar alivio a los pacientes con enfermedades artríticas o autoinmunes al limitar la secreción de células inflamatorias localizadas. La inyección en las áreas que rodean las terminaciones nerviosas puede inhibir la secreción de algunos tipos de neurotransmisores, bloqueando la transmisión de dolor intenso o espasmos musculares descontrolados. El suministro del péptido para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel debe realizarse fácilmente utilizando diversas formulaciones tópicas conocidas en la técnica.

Se cree que MARCKS interactúa con la actina y la miosina en el citoplasma y, por lo tanto, puede ser capaz de atar los gránulos al aparato contráctil celular, mediando así el movimiento posterior de los gránulos y la exocitosis. La secreción de la MPO mediadora inflamatoria de los neutrófilos también se puede maximizar mediante la activación de PKC y PKG. Es posible que MARCKS sirva como punto de convergencia para coordinar las acciones de estas dos proteínas quinasas que controlan la secreción de los compartimentos unidos a la membrana en las células inflamatorias (es decir, la secreción de MPO de los neutrófilos).

En el presente documento se demuestra que la secreción del mediador inflamatorio MPO de neutrófilos caninos o humanos se incrementó mediante la activación concurrente tanto de PKC como de PKG, mientras que la activación de cualquiera de las quinasas solo fue insuficiente para inducir una respuesta secretora máxima. Se ha documentado una respuesta secretora mejorada a la PMA sola en células NHBE y en neutrófilos, como se demuestra en el presente documento, aunque la magnitud de la respuesta fue mucho menor que la observada por otros en una línea celular tipo copa de rata. Véase, Abdullah et al, supra. Además, aunque se informó previamente que un análogo de GMPc podría inducir una secreción significativa de mucina a partir de células epiteliales traqueales de cobaya cultivadas (Fischer et al., Supra), se debe tener en cuenta que esta respuesta no alcanzó niveles significativos hasta las 8 h de exposición. Es poco probable que una respuesta secretora con un período de retraso tan largo sea un efecto directo y probablemente implique la síntesis de proteínas de novo en lugar de la liberación de gránulos citoplásmicos preformados y almacenados.

Como se indicó anteriormente, los péptidos se pueden usar en una formulación farmacéutica. El producto farmacológico puede presentarse en una composición farmacéutica sólida que puede ser adecuada para la administración oral. Una composición sólida de materia de acuerdo con la presente invención puede formarse y puede mezclarse con y/o diluirse mediante un excipiente. La composición sólida de materia también puede estar encerrada dentro de un portador, que puede estar, por ejemplo, en forma de cápsula, sobre, tableta, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo, portador o medio para la composición de la materia.

Los expertos en la técnica entenderán varios excipientes adecuados y se pueden encontrar en el National Formulary, 19: 2404-2406 (2000), páginas 2404 a 2406. Ejemplos de excipientes adecuados incluyen, entre otros, almidones y goma de mascar árabe, silicato de calcio, celulosa microcristalina, metacrilatos, laca, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones de productos farmacológicos pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como, por ejemplo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y suspensores; agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo y propilo; agentes edulcorantes; o agentes aromatizantes. También se pueden usar polioles, reguladores y rellenos inertes. Ejemplos de polioles incluyen, pero no se limitan a, manitol, sorbitol, xilitol, sacarosa, maltosa, glucosa, lactosa, dextrosa y similares. Los reguladores adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato, citrato, tartrato, succinato y similares. Otros rellenos inertes que pueden usarse incluyen aquellos que son conocidos en la técnica y son útiles en la fabricación de diversas formas de dosificación. Si se desea, las formulaciones sólidas pueden incluir otros componentes tales como agentes de carga y/o agentes de granulación, y similares. Los productos farmacológicos de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Para formar comprimidos para administración oral, la composición de la materia de la presente invención se puede preparar mediante un proceso de compresión directa. En este proceso, los ingredientes activos del fármaco se pueden mezclar con un vehículo sólido, pulverizador tal como, por ejemplo, lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, agentes antifricción tales como, por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de calcio y ceras de polietilenglicol. La mezcla se puede presionar en tabletas utilizando una máquina con los punzones y matrices apropiados para obtener el tamaño de tableta deseado. Los parámetros operativos de la máquina pueden ser seleccionados por el experto en la materia. Alternativamente, los comprimidos para administración oral pueden formarse mediante un proceso de granulación húmeda. Los ingredientes activos del fármaco se pueden mezclar con excipientes y/o diluyentes. Las sustancias sólidas pueden molerse o tamizarse a un tamaño de partícula deseado. Se puede añadir un agente de unión al fármaco. El agente de unión puede suspenderse y homogeneizarse en un disolvente adecuado. El ingrediente activo y los agentes auxiliares también pueden mezclarse con la solución de agente aglutinante. La mezcla seca resultante se humedece con la solución uniformemente. La humectación generalmente hace que las partículas se agreguen ligeramente, y la masa resultante se presiona a través de un tamiz de acero inoxidable que tiene un tamaño deseado. La mezcla se seca luego en unidades de secado controladas durante el tiempo determinado necesario para lograr un tamaño de partícula y una consistencia deseados. Los gránulos de la mezcla seca se tamizan para eliminar cualquier polvo. A esta mezcla, se pueden agregar agentes desintegrantes, antifricción y/o antiadhesivos. Finalmente, la mezcla se presiona en tabletas utilizando una máquina con los punzones y moldes apropiados para obtener el tamaño de tableta deseado. Los parámetros operativos de la máquina pueden ser seleccionados por el experto en la materia.

Si se desean tabletas recubiertas, el núcleo preparado anteriormente puede recubrirse con una solución concentrada de azúcar o polímeros celulósicos, que pueden contener goma arábiga, gelatina, talco, dióxido de titanio o con una laca disuelta en un disolvente orgánico volátil o una mezcla de solventes. A este recubrimiento se pueden agregar varios colorantes para distinguir entre tabletas con diferentes compuestos activos o con diferentes cantidades del compuesto activo presente. El ingrediente activo puede estar presente en un núcleo rodeado por una o más capas que incluyen capas de recubrimiento entérico.

Se pueden preparar cápsulas de gelatina blanda en las que las cápsulas contienen una mezcla del ingrediente activo y aceite vegetal. Las cápsulas de gelatina dura pueden contener gránulos del ingrediente activo en combinación con un vehículo sólido y pulverulento, como, por ejemplo, lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón de patata, almidón de maíz, amilopectina, derivados de celulosa y/o gelatina.

Las preparaciones líquidas para administración oral se pueden preparar en forma de jarabes o suspensiones, por ejemplo, soluciones que contienen un ingrediente activo, azúcar y una mezcla de etanol, agua, glicerol y propilenglicol. Si se desea, tales preparaciones líquidas pueden comprender uno o más de los siguientes: agentes colorantes, agentes aromatizantes y sacarina. También se pueden usar agentes espesantes tales como carboximetilcelulosa.

En el caso de que los productos farmacéuticos anteriores se usen para administración parenteral, tal formulación puede comprender soluciones de inyección acuosas estériles, soluciones de inyección no acuosas, o ambas, que comprenden la composición de la materia de la presente invención. Cuando se preparan soluciones de inyección acuosas, la composición de materia puede estar presente como una sal farmacéuticamente aceptable soluble en agua. Las preparaciones parenterales pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden comprender agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

La composición de la materia también puede formularse de modo que pueda ser adecuada para la administración tópica (por ejemplo, crema para la piel). Estas formulaciones pueden contener diversos excipientes conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes adecuados pueden incluir, entre otros, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetílico, cera blanca, monoestearato de glicerilo, propilenglicol, monoestearato, estearato de metilo, alcohol bencílico, laurilsulfato de sodio, glicerina, aceite mineral, agua, carbómero, alcohol etílico, adhesivos de acrilato, adhesivos de poliisobutileno y adhesivos de silicona.

Los fragmentos de péptidos se describen en la Tabla 2 y tienen una longitud de al menos 4 a 23 residuos de aminoácidos de longitud y tienen secuencias de aminoácidos idénticas a una secuencia de aminoácidos del péptido MANS, en donde el aminoácido N-terminal de los péptidos se seleccionan de la posición 2 a 21 de la secuencia peptídica de MANS (SEQ ID NO: 1). La longitud de fragmento de péptido más preferida es de al menos 6 aminoácidos a 23 aminoácidos. Preferiblemente, estos péptidos se acilan en el aminoácido alfa N-terminal, y más preferiblemente estos péptidos están miristoilados en la posición del aminoácido alfa-N-terminal.

Tabla 2.

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 3	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 3
péptido 5	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 5
péptido 8	AQFSKTAAKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 8
péptido 12	AQFSKTAAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 12
péptido 17	AQFSKTAAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 17
péptido 23	AQFSKTAAKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 23
péptido 30	AQFSKTAAKGEEAAERP	SEQ ID NO. 30
péptido 38	AQFSKTAAKGEEAAER	SEQ ID NO. 38

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 47	AQFSKTAAKGEAAAE	SEQ ID NO. 47
péptido 57	AQFSKTAAKGEAAA	SEQ ID NO. 57
péptido 68	AQFSKTAAKGEAA	SEQ ID NO. 68
péptido 80	AQFSKTAAKGEA	SEQ ID NO. 80
péptido 93	AQFSKTAAKGE	SEQ ID NO. 93
péptido 107	AQFSKTAAKG	SEQ ID NO. 107
péptido 122	AQFSKTAAK	SEQ ID NO. 122
péptido 138	AQFSKTAA	SEQ ID NO. 138
péptido 155	AQFSKTA	SEQ ID NO. 155
péptido 173	AQFSKT	SEQ ID NO. 173
péptido 192	AQFSK	SEQ ID NO. 192
péptido 212	AQFS	SEQ ID NO. 212
péptido 6	QFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 6
péptido 9	QFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 9
péptido 13	QFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 13
péptido 18	QFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEQ ID NO. 18
péptido 24	QFSKTAAKGEAAAERPGE	SEQ ID NO. 24
péptido 31	QFSKTAAKGEAAAERPG	SEQ ID NO. 31
péptido 39	QFSKTAAKGEAAAERP	SEQ ID NO. 39
péptido 48	QFSKTAAKGEAAAER	SEQ ID NO. 48
péptido 58	QFSKTAAKGEAAAE	SEQ ID NO. 58
péptido 69	QFSKTAAKGEAAA	SEQ ID NO. 69
péptido 81	QFSKTAAKGEAA	SEQ ID NO. 81
péptido 94	QFSKTAAKGEA	SEQ ID NO. 94
péptido 108	QFSKTAAKGE	SEQ ID NO. 108

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 123	QFSKTAAG	SEQ ID NO. 123
péptido 139	QFSKTAAG	SEQ ID NO. 139
péptido 156	QFSKTAA	SEQ ID NO. 156
péptido 174	QFSKTA	SEQ ID NO. 174
péptido 193	QFSKT	SEQ ID NO. 193
péptido 213	QFSK	SEQ ID NO. 213
péptido 10	FSKTAAGGEGAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 10
péptido 14	FSKTAAGGEGAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 14
péptido 19	FSKTAAGGEGAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 19
péptido 25	FSKTAAGGEGAAAERPGEA	SEQ ID NO. 25
péptido 32	FSKTAAGGEGAAAERPGE	SEQ ID NO. 32
péptido 40	FSKTAAGGEGAAAERPG	SEQ ID NO. 40
péptido 49	FSKTAAGGEGAAAERP	SEQ ID NO. 49
péptido 59	FSKTAAGGEGAAAER	SEQ ID NO. 59
péptido 70	FSKTAAGGEGAAAEE	SEQ ID NO. 70
péptido 82	FSKTAAGGEGAAA	SEQ ID NO. 82
péptido 95	FSKTAAGGEAA	SEQ ID NO. 95
péptido 109	FSKTAAGGEEA	SEQ ID NO. 109
péptido 124	FSKTAAGGE	SEQ ID NO. 124
péptido 140	FSKTAAGG	SEQ ID NO. 140
péptido 157	FSKTAAG	SEQ ID NO. 157
péptido 175	FSKTAA	SEQ ID NO. 175
péptido 194	FSKTA	SEQ ID NO. 194
péptido 214	FSKT	SEQ ID NO. 214
péptido 15	SKTAAGGEGAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 15

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 20	SKTAAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 20
péptido 26	SKTAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 26
péptido 33	SKTAAKGEEAAAERPGEA	SEQ ID NO. 33
péptido 41	SKTAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO. 41
péptido 50	SKTAAKGEEAAAERPG	SEQ ID NO. 50
péptido 60	SKTAAKGEEAAAERP	SEQ ID NO. 60
péptido 71	SKTAAKGEEAAAER	SEQ ID NO. 71
péptido 83	SKTAAKGEEAAAEE	SEQ ID NO. 83
péptido 96	SKTAAKGEEAAA	SEQ ID NO. 96
péptido 110	SKTAAKGEEAA	SEQ ID NO. 110
péptido 125	SKTAAKGEEA	SEQ ID NO. 125
péptido 141	SKTAAKGEE	SEQ ID NO. 141
péptido 158	SKTAAKG	SEQ ID NO. 158
péptido 176	SKTAAK	SEQ ID NO. 176
péptido 195	SKTAA	SEQ ID NO. 195
péptido 215	SKTA	SEQ ID NO. 215
péptido 21	KTAAKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 21
péptido 27	KTAAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 27
péptido 34	KTAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 34
péptido 42	KTAAKGEEAAAERPGEA	SEQ ID NO. 42
péptido 51	KTAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO. 51
péptido 61	KTAAKGEEAAAERPG	SEQ ID NO. 61
péptido 72	KTAAKGEEAAAERP	SEQ ID NO. 72
péptido 84	KTAAKGEEAAAER	SEQ ID NO. 84
péptido 97	KTAAKGEEAAAEE	SEQ ID NO. 97

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 111	KTAAKGEEAAA	SEQ ID NO. 111
péptido 126	KTAAKGEEAA	SEQ ID NO. 126
péptido 142	KTAAKGEEA	SEQ ID NO. 142
péptido 159	KTAAKGEE	SEQ ID NO. 159
péptido 177	KTAAKGE	SEQ ID NO. 177
péptido 196	KTAAK	SEQ ID NO. 196
péptido 216	KTAA	SEQ ID NO. 216
péptido 28	TAAKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 28
péptido 35	TAAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 35
péptido 43	TAAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 43
péptido 52	TAAKGEEAAAERPGEA	SEQ ID NO. 52
péptido 62	TAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO. 62
péptido 73	TAAKGEEAAAERPGE	SEQ ID NO. 73
péptido 85	TAAKGEEAAAERP	SEQ ID NO. 85
péptido 98	TAAKGEEAAAER	SEQ ID NO. 98
péptido 112	TAAKGEEAAAEE	SEQ ID NO. 112
péptido 127	TAAKGEEAAA	SEQ ID NO. 127
péptido 143	TAAKGEEAA	SEQ ID NO. 143
péptido 160	TAAKGEEA	SEQ ID NO. 160
péptido 178	TAAKGEE	SEQ ID NO. 178
péptido 197	TAAKGE	SEQ ID NO. 197
péptido 217	TAAKGE	SEQ ID NO. 217
péptido 36	AAKGEEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 36
péptido 44	AAKGEEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 44
péptido 53	AAKGEEAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 53

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 63	AAKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 63
péptido 74	AAKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 74
péptido 86	AAKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 86
péptido 99	AAKGEEAAERP	SEQ ID NO. 99
péptido 113	AAKGEEAAER	SEQ ID NO. 113
péptido 128	AAKGEEAAE	SEQ ID NO. 128
péptido 144	AAKGEEAAA	SEQ ID NO. 144
péptido 161	AAKGEEAA	SEQ ID NO. 161
péptido 179	AAKGEEA	SEQ ID NO. 179
péptido 198	AAKGEE	SEQ ID NO. 198
péptido 218	AAKGE	SEQ ID NO. 218
péptido 45	AKGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 45
péptido 54	AKGEEAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 54
péptido 64	AKGEEAAERPGEAA	SEQ ID NO. 64
péptido 75	AKGEEAAERPGEA	SEQ ID NO. 75
péptido 87	AKGEEAAERPGE	SEQ ID NO. 87
péptido 100	AKGEEAAERPG	SEQ ID NO. 100
péptido 114	AKGEEAAERP	SEQ ID NO. 114
péptido 129	AKGEEAAER	SEQ ID NO. 129
péptido 145	AKGEEAAE	SEQ ID NO. 145
péptido 162	AKGEEAAA	SEQ ID NO. 162
péptido 180	AKGEEAA	SEQ ID NO. 180
péptido 199	AKGEEA	SEQ ID NO. 199
péptido 219	AKGEE	SEQ ID NO. 219
péptido 55	KGEEAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 55

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 65	KGAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 65
péptido 76	KGAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 76
péptido 88	KGAAAERPGEA	SEQ ID NO. 88
péptido 101	KGAAAERPGE	SEQ ID NO. 101
péptido 115	KGAAAERPG	SEQ ID NO. 115
péptido 130	KGAAAERP	SEQ ID NO. 130
péptido 146	KGAAAER	SEQ ID NO. 146
péptido 163	KGAAA	SEQ ID NO. 163
péptido 181	KGAAA	SEQ ID NO. 181
péptido 200	KGAA	SEQ ID NO. 200
péptido 220	KGEA	SEQ ID NO. 220
péptido 66	GEAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 66
péptido 77	GEAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 77
péptido 89	GEAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 89
péptido 102	GEAAAERPGEA	SEQ ID NO. 102
péptido 116	GEAAAERPGE	SEQ ID NO. 116
péptido 131	GEAAAERPG	SEQ ID NO. 131
péptido 147	GEAAAERP	SEQ ID NO. 147
péptido 164	GEAAAER	SEQ ID NO. 164
péptido 182	GEAAA	SEQ ID NO. 182
péptido 201	GEAAA	SEQ ID NO. 201
péptido 221	GEAA	SEQ ID NO. 221
péptido 78	EAAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 78
péptido 90	EAAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 90
péptido 103	EAAAERPGEAA	SEQ ID NO. 103

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 117	EAAAERPGEA	SEQ ID NO. 117
péptido 132	EAAAERPGE	SEQ ID NO. 132
péptido 148	EAAAERPG	SEQ ID NO. 148
péptido 165	EAAAERP	SEQ ID NO. 165
péptido 183	EAAAER	SEQ ID NO. 183
péptido 202	EAAAE	SEQ ID NO. 202
péptido 222	EAAA	SEQ ID NO. 222
péptido 91	AAAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 91
péptido 104	AAAERPGEAAV	SEQ ID NO. 104
péptido 118	AAAERPGEAA	SEQ ID NO. 118
péptido 133	AAAERPGEA	SEQ ID NO. 133
péptido 149	AAAERPGE	SEQ ID NO. 149
péptido 166	AAAERPG	SEQ ID NO. 166
péptido 184	AAAERP	SEQ ID NO. 184
péptido 203	AAAER	SEQ ID NO. 203
péptido 223	AAAE	SEQ ID NO. 223
péptido 105	AAERPGEAAVA	SEQ ID NO. 105
péptido 119	AAERPGEAAV	SEQ ID NO. 119
péptido 134	AAERPGEAA	SEQ ID NO. 134
péptido 150	AAERPGEA	SEQ ID NO. 150
péptido 167	AAERPGE	SEQ ID NO. 167
péptido 185	AAERPG	SEQ ID NO. 185
péptido 204	AAERP	SEQ ID NO. 204
péptido 224	AAER	SEQ ID NO. 224
péptido 120	AERPGEAAVA	SEQ ID NO. 120

ES 2 725 599 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 135	AERPGEAAV	SEQ ID NO. 135
péptido 151	AERPGEAA	SEQ ID NO. 151
péptido 168	AERPGEA	SEQ ID NO. 168
péptido 186	AERPGE	SEQ ID NO. 186
péptido 205	AERPG	SEQ ID NO. 205
péptido 225	AERP	SEQ ID NO. 225
péptido 136	ERPGEAAVA	SEQ ID NO. 136
péptido 152	ERPGEAAV	SEQ ID NO. 152
péptido 169	ERPGEAA	SEQ ID NO. 169
péptido 187	ERPGEA	SEQ ID NO. 187
péptido 206	ERPGE	SEQ ID NO. 206
péptido 226	ERPG	SEQ ID NO. 226
péptido 153	RPGEAAVA	SEQ ID NO. 153
péptido 170	RPGEAAV	SEQ ID NO. 170
péptido 188	RPGEAA	SEQ ID NO. 188
péptido 207	RPGEA	SEQ ID NO. 207
péptido 227	RPGE	SEQ ID NO. 227
péptido 171	PGEAAVA	SEQ ID NO. 171
péptido 189	PGEAAV	SEQ ID NO. 189
péptido 208	PGEAA	SEQ ID NO. 208
péptido 228	PGEA	SEQ ID NO. 228
péptido 190	GEAAVA	SEQ ID NO. 190
péptido 209	GEAAV	SEQ ID NO. 209
péptido 229	GEAA	SEQ ID NO. 229
péptido 210	EAAVA	SEQ ID NO. 210

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 230	EAAV	SEQ ID NO. 230
péptido 231	AAVA	SEQ ID NO. 231

Como se ilustra en la Figura 5, MARCKS se fosforiló por PKC y, en consecuencia, se translocó desde la membrana al citoplasma. Aquí, PKG pareció inducir la desfosforilación de MARCKS (Figura 2A, carril 4 y Figura 2B). Esta desfosforilación fue revertida por el inhibidor de PKG R<sub>p</sub>-8-Br-PET-cGMP (Figura 2A, carril 5), lo que indica que la desfosforilación era específicamente dependiente de PKG. En la Figura 2, las células NHBE se marcaron con ortofosfato [<sup>32</sup>P] y luego se expusieron a los reactivos indicados. La fosforilación de MARCKS en respuesta a los tratamientos se evaluó mediante un ensayo de inmunoprecipitación. En la Figura 2A, 8-Br-cGMP revirtió la fosforilación de MARCKS inducida por PMA, y este efecto de 8-Br-cGMP podría ser bloqueado por R<sub>p</sub>-8-Br-PET-cGMP (inhibidor de PKG) o ácido okadaico (inhibidor de PP1/2A). Para la Figura 2B, la fosforilación de MARCKS inducida por PMA se revirtió mediante la exposición posterior de las células a 8-Br-cGMP. Carril 1, medio solo durante 8 min; carril 2, PMA 100 nM durante 3 min; carril 3, PMA 100 nM durante 3 min y luego con 1 μM de 8-Br-cGMP durante 5 min; carril 4, PMA 100 nM durante 8 min; carril 5, medio solo durante 3 min y luego 100 nM PMA+1 μM 8-Br-cGMP durante 5 min. En la Figura 2C, la desfosforilación de MARCKS inducida por 8-Br-cGMP fue atenuada por la fostriecina de una manera dependiente de la concentración.

Se cree que PKG actúa para desfosforilar MARCKS mediante la activación de una proteína fosfatasa. Como se ilustra en la Figura 2A (carril 6), el ácido okadaico a 500 nM, una concentración que podría inhibir tanto PP1 como PP2A, bloqueó la desfosforilación de MARCKS inducida por PKG, lo que sugiere que la PKG causó desfosforilación al activar PP1 y/o PP2A. Otros estudios con fostriecina y el ensayo directo de las actividades de la fosfatasa indicaron que solo la PP2A fue activada por PKG y fue responsable de la eliminación de los grupos fosfato de MARCKS (Figura 2C). Es probable que el ácido okadaico o la fostriecina, a concentraciones que inhiban la desfosforilación de MARCKS inducida por PKG, la secreción de mucina atenuada inducida por PMA+8-Br-cGMP o UTP como se muestra en la Figura 3. La Figura 3 ayuda a demostrar que PP2A es un componente esencial de la vía secretora de mucina. Las células NHBE se preincubaron con la concentración indicada de fostriecina, ácido okadaico (500 nM) o medio solo durante 15 minutos y luego se estimularon con PMA (100 nM)+8-Br-cGMP (1 μM) durante 15 minutos o con UTP (100 μM) durante 2 h. La mucina secretada se midió por ELISA. Los datos se presentan como media. ±. S.E. (n= 6 en cada punto) en donde \* significa significativamente diferente del control del medio (p<0.05); † significa significativamente diferente de la estimulación PMA+8-Br-cGMP (p<0.05); y ‡ significa significativamente diferente de la estimulación UTP p<0.05). Por lo tanto, la desfosforilación de MARCKS por un PP2A activado por PKG parece ser un componente esencial de la vía de señalización que conduce a la exocitosis de gránulos de mucina.

Para revelar eventos moleculares mediante los cuales MARCKS vincula la activación de la quinasa con la secreción de mucina, se investigó en profundidad la fosforilación de MARCKS en respuesta a la activación de PKC/PKG. Como se ilustra en la Figura 1A, PMA (100 nM) probablemente indujo un aumento significativo (3-4 veces) en la fosforilación de MARCKS en células NHBE, y esta fosforilación fue atenuada por el inhibidor de la PKC calfofostina C (500 nM). Una vez fosforilada, MARCKS se translocó de la membrana plasmática al citoplasma (Figura 1B). Más específicamente, la Figura 1A muestra la activación de los resultados de PKC en la fosforilación de MARCKS en células NHBE. Las células se marcaron con [<sup>32</sup>P] ortofosfato durante 2 h y luego se expusieron a los reactivos estimulantes y/o inhibidores. La fosforilación de MARCKS en respuesta a los tratamientos se evaluó mediante inmunoprecipitación como se describe. Carril 1, control medio; carril 2 el vehículo, 0.1% de Me<sub>2</sub>SO; carril 3, 4α-PMA 100 nM; carril 4, PMA 100 nM; carril 5. 100 nM PMA+500 nM calfofostina C; carril 6, 500 nM de calfofostina C. Figura 1B demuestra que los MARCKS fosforilados se trasladan de la membrana plasmática al citoplasma. Las células marcadas con <sup>32</sup>P se expusieron a PMA (100 nM) o medio solo durante 5 min, y luego se aislaron la membrana y las fracciones de citosol. La activación de PKG por 8-Br-cGMP (1 μM, otro evento de activación de quinasa necesario para provocar la secreción de mucina, no dio lugar a la fosforilación de MARCKS, pero, de hecho, se observó el efecto contrario: la fosforilación de MARCKS inducida por PMA se revirtió en 8-Br-cGMP (Figura 2A). Este efecto de 8-Br-cGMP no se debió a la supresión de la actividad de PKC, ya que la fosforilación inducida por PMA podría revertirse mediante la adición posterior de 8-Br-cGMP a las células (Figura 2B). Por lo tanto, la activación de PKG probablemente resulte en la desfosforilación de MARCKS.

Una investigación adicional demostró que la desfosforilación de MARCKS inducida por PKG estaba bloqueada por ácido okadaico 500 nM, una proteína fosfatasa (tipo 1 y/o 2A (PP1/2A)) inhibidor (Figura 2A, carril 6). Por lo tanto, parece que la desfosforilación fue mediada por PP1 y/o PP2A. Para definir el subtipo de proteína fosfatasa involucrada, se utilizó un inhibidor novedoso y más específico de PP2A, fostriecina (IC<sub>50</sub>=3.2 nM), en estudios de fosforilación adicionales. Como se ilustra en la Figura 2C, la fostriecina inhibió la desfosforilación de MARCKS inducida por PKG de una manera dependiente de la concentración (1-500 nM), lo que sugiere que la PKG indujo la desfosforilación a través de la activación de PP2A. Para confirmar la activación adicional de PP2A por PKG en células NHBE, se determinaron las actividades citosólicas de PP1 y PP2A después de la exposición de las células a 8-Br-cGMP. La actividad de PP2A aumentó aproximadamente 3 veces (de 0.1 a 0.3 nmol/min/mg de proteínas, p<0.01) a concentraciones de 8-Br-cGMP tan bajas como 0.1 μM, mientras que la actividad de PP1 permaneció sin cambios. Estos datos indican que PP2A puede ser activado por PKG y es responsable de la desfosforilación de MARCKS. Por consiguiente, esta actividad de PP2A parecía crítica para que se produjera la secreción de mucina; cuando la desfosforilación de MARCKS inducida por PKG fue bloqueada

por ácido okadaico o fostriecina, la respuesta secretora a la activación de PKC/PKG o la estimulación con UTP se mejoró (Figura 3).

MARCKS se asocia con actina y miosina en el citoplasma

5 La Figura 4 muestra un ensayo de inmunoprecipitación radiomarcado que revela que MARCKS puede asociarse con otras  
 10 dos proteínas (aproximadamente 200 y aproximadamente 40 kDa) en el citoplasma. En la Figura 4 células NHBE se  
 marcaron con [<sup>3</sup>H] leucina y [<sup>3</sup>H] prolina durante la noche, y las fracciones de membrana y citosol se prepararon como se  
 describe en "Procedimientos experimentales". Las fracciones aisladas se preaclaron con el anticuerpo de control no  
 inmune (6F6). Luego, el citosol se dividió por igual en dos fracciones y se usó para la inmunoprecipitación realizada en  
 presencia de citocalasina D 10 μM (Biomol, Plymouth Meeting, Pa.) con el anticuerpo anti-MARCKS 2F12 (carril 2) y el  
 15 anticuerpo de control no inmune 6F6 (carril 3), respectivamente. La proteína MARCKS en la fracción de membrana  
 también se evaluó mediante inmunoprecipitación usando el anticuerpo 2F12 (carril 1). El complejo proteico precipitado se  
 resolvió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 8% y se visualizó mediante autorradiografía mejorada.  
 MARCKS pareció asociarse con dos proteínas citoplásmicas con masas moleculares de aproximadamente 200 y  
 aproximadamente 40 kDa, respectivamente. Estas dos proteínas asociadas a MARCKS se escindieron del gel y se  
 20 analizaron mediante ionización de desorción con láser asistida por matriz/espectrometría de masas/tiempo de  
 vuelo/secuenciación interna (Centro de Tecnología de Proteínas/ADN de la Universidad de Rockefeller, N.Y.). La masa  
 de péptidos obtenida y los datos de secuencia se utilizaron para buscar en las bases de datos de proteínas a través de  
 los programas de Internet ProFound y MS-Fit. Los resultados indican que son miosina (cadena pesada, tipo A no muscular)  
 y actina, respectivamente. La ionización por desorción láser asistida por matriz/tiempo de vuelo espectrometría de  
 25 masas/análisis de secuencia interna indica que estas dos proteínas asociadas a MARCKS fueron miosina (cadena  
 pesada, tipo A no muscular) y actina, respectivamente.

Estos estudios sugieren un nuevo paradigma para el mecanismo de señalización que controla la secreción exocítica de  
 los gránulos de mucina de las vías respiratorias, además de proporcionar lo que se cree que es la primera evidencia  
 30 directa que demuestra una función biológica específica de MARCKS en un proceso fisiológico. MARCKS sirve como una  
 molécula mediadora clave que regula la liberación de gránulos de mucina en las células epiteliales de las vías respiratorias  
 humanas. Se cree que la provocación de la secreción de mucina de las vías respiratorias requiere activación dual y  
 acciones sinérgicas de PKC y PKG. La PKC activada fosforila los MARCKS, lo que resulta en la translocación de los  
 MARCKS desde la cara interna de la membrana plasmática hacia el citoplasma. La activación de PKG a su vez activa  
 PP2A, que desfosforila MARCKS en el citoplasma. Debido a que la capacidad de asociación de membrana de MARCKS  
 depende de su estado de fosforilación, esta desfosforilación puede permitir que MARCKS recupere su capacidad de unión  
 a la membrana y puede permitir que MARCKS se adhiera a las membranas de los gránulos de mucina citoplásmica. Al  
 interactuar también con la actina y la miosina en el citoplasma (Figura 4), MARCKS puede entonces atar los gránulos al  
 aparato contráctil celular, mediando el movimiento de los gránulos en la periferia de la célula y la posterior liberación  
 exocítica. La amplia distribución de MARCKS sugiere la posibilidad de que este o un mecanismo similar pueda regular la  
 35 secreción de gránulos unidos a la membrana en varios tipos de células en condiciones normales o patológicas.

Como se indica en la Figura 5, MARCKS puede funcionar como un enlazador molecular al interactuar con las membranas  
 granulares en su dominio N-terminal y unirse a los filamentos de actina en su sitio PSD, vinculando así los gránulos al  
 citoesqueleto contráctil para el movimiento y la exocitosis. La Figura 5 muestra un posible mecanismo que representa que  
 40 el secretagogo de mucina interactúa con las células epiteliales de las vías respiratorias (cáliz) y activa dos proteínas  
 quinasas separadas, PKC y PKG. La PKC activada fosforila MARCKS, causando la translocación MARCKS de la  
 membrana plasmática al citoplasma, mientras que la PKG, activada a través del óxido nítrico (NO) → GC-S → cGMP →  
 PKG, a su vez activa un PP2A citoplásmico, que desfosforila MARCKS. Esta desfosforilación estabiliza la unión de  
 MARCKS a las membranas de los gránulos. Además, MARCKS también interactúa con la actina y la miosina, vinculando  
 45 así los gránulos a la maquinaria contráctil celular para el movimiento subsiguiente y la liberación exocítica de mediadores  
 inflamatorios, como la MPO. La unión de MARCKS a los gránulos después de que se libera en el citoplasma también  
 puede guiarse por proteínas específicas dirigidas o algunas otras formas de interacciones proteína-proteína en las que  
 está involucrado el dominio N-terminal de MARCKS. En cualquier caso, el péptido MANS, o un fragmento activo del  
 mismo, que comprende al menos 4 aminoácidos, actuaría para inhibir el direccionamiento competitivo de MARCKS a las  
 membranas de los gránulos de mucina, bloqueando así la secreción.

50 La invención se basa en el uso de péptidos como se define en el primer aspecto para bloquear cualquier proceso secretor  
 exocítico celular, especialmente los que liberan mediadores inflamatorios de los gránulos contenidos en las células  
 inflamatorias, cuyas vías estimulantes involucran la proteína MARCKS del sustrato de la proteína quinasa C (PKC) y la  
 liberación de los contenidos de vesículas unidas a la membrana. Específicamente, los inventores han demostrado que el  
 péptido MANS puede bloquear de manera dependiente de la concentración la liberación estimulada de la mieloperoxidasa  
 55 mediadora inflamatoria de los neutrófilos humanos (Figura 6) o caninos (Figura 7). Específicamente, la Figura 6 muestra  
 neutrófilos aislados que se estimularon para secretar mieloperoxidasa (MPO) con PMA 100 nM y 10 μM de 8-Br-cGMP. El  
 péptido MANS 100 μM redujo la secreción de MPO a niveles de control (\*=p<0.05). 10 μM MANS causa una ligera  
 disminución en la secreción de MPO. 10 o 100 μM de un péptido de control (RNS) no tiene ningún efecto sobre la secreción  
 de MPO. En la Figura 7, los neutrófilos aislados se estimularon para secretar mieloperoxidasa (MPO) con PMA 100 nM y  
 60 10 μM 8-Br-cGMP. El péptido MANS 100 μM redujo la secreción de MPO a niveles de control (\*=p<0.05). 10 μM MANS  
 causa una ligera disminución en la secreción de MPO. 10 o 100 μM de un péptido de control (RNS) no tiene ningún efecto  
 sobre la secreción de MPO. Por lo tanto, el péptido se puede usar terapéuticamente para bloquear la liberación de

mediadores de la inflamación secretada a partir de células inflamatorias infiltrantes en cualquier tejido. Muchos de estos mediadores liberados son responsables del extenso daño tisular observado en una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas (es decir, enfermedades respiratorias como el asma, la bronquitis crónica y la EPOC, enfermedades inflamatorias del intestino que incluyen colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunes, enfermedades de la piel como como rosácea, eczema y acné severo, síndromes artríticos y dolorosos, como artritis reumatoide y fibromialgia). Los péptidos pueden ser útiles para tratar enfermedades como la artritis, la bronquitis crónica, la EPOC y la fibrosis quística. Sin embargo, los péptidos para uso de acuerdo con la invención están limitados al uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas que implican inflamación, y específicamente el síndrome de dificultad respiratoria del adulto o lesión térmica aguda. Por consiguiente, esta invención es útil para el tratamiento de enfermedades humanas y animales, especialmente aquellas que afectan a los equinos, caninos, felinos y otras mascotas domésticas.

Las Figuras 8-12 muestran la secreción de MPO tanto para humanos como para caninos. En todos estos experimentos, los neutrófilos aislados se estimularon con LPS a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  antes de agregar los estímulos como se indica en las figuras. El LPS prepara las células para que puedan responder a un secretagogo.

En el presente documento se describe un método para regular una inflamación en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido MANS o un fragmento activo del mismo. Dicho fragmento activo de la proteína MANS comprende al menos cuatro y preferiblemente seis aminoácidos. Dicha inflamación está causada por enfermedades respiratorias, enfermedades intestinales, enfermedades de la piel, enfermedades autoinmunes y síndromes de dolor. Dichas enfermedades respiratorias se seleccionan del grupo que consiste en asma, bronquitis crónica y EPOC. Dichas enfermedades del intestino se seleccionan del grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable. Dichas enfermedades de la piel se seleccionan del grupo que consiste en rosácea, eczema, psoriasis y acné severo. Dicha inflamación es causada por artritis o fibrosis quística. Dicho sujeto es un mamífero. Además, dicho mamífero se selecciona del grupo que consiste en humanos, caninos, equinos y felinos. En otro aspecto, dicha etapa de administración se selecciona del grupo que consiste en administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, administración nasal, inhalación y administración oral. Dicha administración pulmonar se selecciona del grupo de aerosol, inhalador de polvo seco, inhalador de dosis medida y nebulizador.

Se describe un método para regular un proceso secretor celular en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto que comprende un péptido MANS o un fragmento activo del mismo, que regula un mediador inflamatorio en un sujeto. Dicho fragmento activo de la proteína MANS comprende al menos cuatro, y preferiblemente seis aminoácidos. Dicha regulación de un proceso secretor celular está bloqueando o reduciendo un proceso secretor celular. Dicho mediador inflamatorio es causado por enfermedades respiratorias, enfermedades intestinales, enfermedades de la piel, enfermedades autoinmunes y síndromes de dolor. Dichas enfermedades respiratorias se seleccionan del grupo que consiste en asma, bronquitis crónica y EPOC. Dichas enfermedades del intestino se seleccionan del grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable. Dichas enfermedades de la piel se seleccionan del grupo que consiste en rosácea, eczema, psoriasis y acné severo. Dicho mediador inflamatorio es causado por artritis o fibrosis quística. Dicho sujeto es un mamífero. Dicho mamífero se selecciona del grupo que consiste en humanos, caninos, equinos y felinos. Dicha etapa de administración se selecciona del grupo que consiste en administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, administración nasal, inhalación y administración oral. Dicha administración pulmonar se selecciona del grupo de aerosol, inhalador de polvo seco, inhalador de dosis medida y nebulizador.

Se describe un método para reducir la inflamación en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe la liberación de mediadores inflamatorios relacionada con MARCKS, por lo que la liberación de mediadores inflamatorios en el sujeto se reduce en comparación con la que se produciría en ausencia de dicho tratamiento. El compuesto Sid es al menos un fragmento activo de una proteína MARCKS. Dicho fragmento activo tiene al menos cuatro y preferiblemente seis aminoácidos de longitud. Dicho compuesto es un péptido MANS o un fragmento activo del mismo. Dicho compuesto es un oligonucleótido antisentido dirigido contra la secuencia codificante de una proteína MARCKS o un fragmento activo de la misma. Dicho fragmento activo tiene al menos cuatro y preferiblemente seis aminoácidos de longitud.

Se describe un método para reducir la inflamación en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéuticamente activa que comprende un compuesto que inhibe la liberación de mediadores inflamatorios relacionada con MARCKS, por lo que la inflamación en el sujeto se reduce en comparación con la que se produciría en ausencia de dicho tratamiento. Dicho compuesto es un fragmento activo de una proteína MARCKS. Dicho fragmento activo tiene al menos cuatro y preferiblemente seis aminoácidos de longitud. Dicho compuesto es un péptido MANS o un fragmento activo del mismo. Dicho compuesto es un oligonucleótido antisentido dirigido contra la secuencia codificante de una proteína MARCKS o un fragmento activo de la misma. Dicho fragmento activo tiene al menos cuatro y preferiblemente seis aminoácidos de longitud. Se describe una composición que contiene uno o más de los péptidos MANS o sus fragmentos activos y su uso en el tratamiento para inhibir la liberación de mediadores inflamatorios de gránulos o vesículas de células inflamatorias.

Se describe un método para reducir o inhibir la inflamación en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un péptido que comprende el péptido MANS o un fragmento activo del mismo eficaz para inhibir o suprimir la liberación de un mediador inflamatorio en el sitio de la inflamación. Dicho fragmento activo es de al menos cuatro y preferiblemente de al menos seis aminoácidos de longitud. Dichos mediadores inflamatorios son producidos por células seleccionadas del grupo que consiste en neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y leucocitos. Preferiblemente, las células son leucocitos, más preferiblemente granulocitos, e incluso más preferiblemente neutrófilos, basófilos, eosinófilos o una combinación de los mismos. El agente se administra por vía oral, parenteral, cavitaria, rectal o por un pasaje de aire. Dicha composición comprende además una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un compuesto antiviral, un compuesto antiparasitario, un compuesto antiinflamatorio y un inmunosupresor.

Un fragmento activo de un péptido MANS puede seleccionarse del grupo que consiste en los péptidos como se describe en la Tabla 1. Como se describe en el presente documento, estos péptidos pueden contener unidades estructurales químicas opcionales en el aminoácido N-terminal y/o C-terminal.

Los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar mediante el uso o la administración de combinaciones de los péptidos enumerados en la Tabla 1, es decir, mediante el uso o la administración de uno o más de estos péptidos. Preferiblemente, se usa o administra un único péptido en los métodos descritos en el presente documento.

En respuesta a la activación de la proteína quinasa C (PKC) por un estimulante inflamatorio, la desgranulación en una célula seleccionada del grupo que consta de neutrófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos puede atenuarse mediante la preincubación y la co-incubación con un péptido idéntico a la región N-terminal de la proteína MARCKS, en donde el péptido se selecciona del grupo de fragmentos peptídicos MANS como se describe en la Tabla 1. Aunque los tiempos y las concentraciones pueden variar entre los tipos de células, en todos los casos el péptido MANS atenúa la desgranulación inducida por PKC.

Una vez descrita la invención, la misma se ilustrará con referencia a ciertos ejemplos, que se incluyen aquí con fines ilustrativos únicamente, y que no pretenden ser limitativos de la invención.

## 25 Ejemplos

### Métodos y materiales

Ensayo de inmunoprecipitación radiomarcada: Marcadas con fosfato [<sup>32</sup>P], se preincubaron células durante 2 h en medio de Eagle modificado por Dulbecco sin fosfato que contenía 0.2% de albúmina de suero bovino y luego se marcaron con ortofosfato 0.1 mCi/ml [<sup>32</sup>P] (9000 Ci/mmol), PerkinElmer Life Sciences) durante 2 h. Para la marcación con [<sup>3</sup>H] ácido mirístico o <sup>3</sup>H-aminoácidos, las células se incubaron durante la noche en un medio que contenía 50 µCi/ml [<sup>3</sup>H] ácido mirístico (49 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) o 0.2 mCi/ml [<sup>3</sup>H] leucina (159 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) más 0.4 mCi/ml [<sup>3</sup>H] prolina (100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences). Tras el etiquetado, las células se expusieron a reactivos estimulantes durante 5 min. Cuando se usó un inhibidor, las células se preincubaron con el inhibidor durante 15 minutos antes de la estimulación. Al final de los tratamientos, las células se sometieron a lisis en un regulador que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10%, Nonidet P-40 al 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 1 mM benzamidina, 10 µg/ml de pepstatina A y 10 µg/ml de leupeptina. La precipitación con ácido tricloroacético y el recuento de centelleo pueden determinar la eficiencia de la radiomarcación en cada cultivo. La inmunoprecipitación de la proteína MARCKS se llevó a cabo de acuerdo con el método de Spizz y Blackshear utilizando lisados celulares que contenían recuentos iguales/min. Spizz et al., J. Biol. Chem. 271, 553-562 (1996). Las proteínas precipitadas se resolvieron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante autorradiografía. En este ensayo se utilizaron anticuerpos anti-MARCKS humanos (2F12) y anticuerpos de control no inmunes (6F6). Para evaluar los complejos de proteínas asociadas a MARCKS o MARCKS en diferentes fracciones subcelulares, las células radiomarcadas y tratadas se rasparon en un regulador de homogeneización (Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 1 mM benzamidina, 10 µg/ml de pepstatina A, 10 µg/ml de leupeptina) y luego se interrumpe por cavitación con nitrógeno (800 libras/pulgada cuadrada durante 20 minutos a 4°C). Los lisados celulares se centrifugaron a 600 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar núcleos y células intactas. Los sobrenadantes posnucleares se separaron en fracciones de membrana y citosol mediante ultracentrifugación a 400 000 x g durante 30 min a 4°C. El sedimento de membrana se solubilizó en el regulador de lisis por sonicación. La inmunoprecipitación se llevó a cabo como se describe anteriormente.

Péptidos relacionados con MARCKS: Tanto la secuencia N-terminal miristoilada (MANS) como los péptidos de la secuencia N-terminal aleatoria (RNS) se sintetizaron en Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco, California), luego se purificaron mediante cromatografía líquida de alta presión (>95% de pureza), y se confirmó por espectroscopía de masas, cada uno de los cuales muestra un solo pico con una masa molecular apropiada. El péptido MANS consistía en una secuencia idéntica a los primeros 24 aminoácidos de MARCKS, es decir, la región N-terminal miristoilada que media en la inserción de MARCKS en membranas, MA-GAQFSKTAACKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1 (donde MA es la cadena de miristoilo N-terminal). El correspondiente péptido de control (RNS) contenía la misma composición de aminoácidos que la MANS pero dispuesta en orden aleatorio, MA-GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF (SEQ ID NO: 232). La presencia de la unidad estructural de miristato hidrófobo en estos péptidos sintéticos aumenta su permeabilidad a las membranas del plasma, lo que permite que los péptidos sean captados fácilmente por las células. Para determinar los

efectos de estos péptidos en la secreción de mucina, las células se preincubaron con los péptidos durante 15 minutos antes de la adición de secretagogos, y luego se midió la secreción de mucina por ELISA.

Oligonucleótidos antisentido: El oligonucleótido antisentido MARCKS y su correspondiente oligonucleótido de control se sintetizaron en Biognostik GmbH (Gotinga, Alemania). Las células NHBE se trataron con 5  $\mu$ M de oligonucleótido antisentido u control durante 3 días (en presencia de 2  $\mu$ g/ml de lipofectina durante las primeras 24 h). Las células se incubaron luego con secretagogos y la secreción de mucina se midió mediante ELISA. Se aislaron ARN total y proteína a partir de células tratadas. El ARNm de MARCKS se evaluó mediante hibridación Northern de acuerdo con procedimientos convencionales utilizando ADNc de MARCKS humano como sonda. El nivel de proteína MARCKS se determinó mediante transferencia Western utilizando IgG1 anti-MARCKS purificado (clon 2F12) como el anticuerpo de detección primario.

Transfección transitoria: El dominio del sitio de fosforilación (PSD) de MARCKS contiene los sitios de fosforilación dependientes de PKC y el sitio de unión del filamento de actina. Para construir un ADNc de MARCKS eliminado por PSD, se generaron dos fragmentos que flanquean la secuencia de PSD (que codifica para 25 aminoácidos) mediante la reacción en cadena de la polimerasa y luego se ligaron a través del sitio XhoI que se unió a los extremos 5' de los cebadores oligonucleotídicos diseñados para reacción en cadena de la polimerasa. El ADNc mutante resultante y el ADNc de MARCKS de tipo salvaje se insertaron cada uno en un vector de expresión de mamífero pcDNA4/TO (Invitrogen, Carlsbad, California). Las construcciones recombinantes aisladas se confirmaron mediante digestiones de restricción y secuenciación de ADN. HBE1 es una línea de células epiteliales bronquiales humanas transformadas por el virus del papiloma que puede producir la secreción de mucina cuando se cultiva en la interfase aire/líquido. La transfección de células HBE1 se llevó a cabo utilizando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células HBE1 diferenciadas que crecieron en la interfaz aire/líquido se disociaron con tripsina/EDTA y se sembraron nuevamente en placas de cultivo de 12 pozos a 1 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>. Después de la incubación durante la noche, las células se transfectaron con el ADNc de MARCKS de tipo salvaje, el ADNc de MARCKS truncado con PSD o ADN de vector. Las células se cultivaron durante 48 h para permitir la expresión génica y luego se expusieron a secretagogos y se midió la secreción de mucina mediante ELISA. Todas las transfecciones se llevaron a cabo en presencia de plásmido pcDNA4/TO/lacZ (Invitrogen) (relación de ADN 6:1, total de 1  $\mu$ g de ADN, relación de ADN a reactivo Effectene = 1:25) para controlar las variaciones en la eficacia de la transfección. Los resultados no mostraron diferencias significativas en las actividades de la  $\beta$ -galactosidasa en lisados celulares aislados de las células transfectadas, lo que indica una eficiencia de transfección similar entre diferentes construcciones de ADN (datos no mostrados). Ensayo de actividad de la proteína fosfatasa: Las actividades de PP1 y PP2A se midieron utilizando un sistema de ensayo de proteína fosfatasa (Life Technologies, Inc.) como se conoce en la técnica con una ligera modificación. Huang et al., Adv. Exp. Med Biol. 396, 209-215 (1996). En resumen, las células NHBE se trataron con 8-Br-cGMP o medio solo durante 5 min. Luego se rasparon las células en un regulador de lisis (Tris-HCl 50 mM (pH 7.4),  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.1%, EDTA 0.1 mM, benzamidina 1 mM, 10  $\mu$ g/ml de pepstatina A, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina) y se rompió por sonicación durante 20 s a 4°C. Los lisados celulares se centrifugaron y los sobrenadantes se guardaron para el ensayo de actividad de fosfatasa. El ensayo se realizó utilizando fosforilasa A marcada con <sup>32</sup>P como sustrato. El <sup>32</sup>Pi liberado fue contado por centelleo. La concentración de proteína de cada muestra se determinó mediante el ensayo de Bradford. La actividad de PP2A se expresó como la actividad de fosfatasa total de la muestra menos la actividad restante en presencia de ácido okadaico 1 nM. La actividad PP1 se expresó como la diferencia entre las actividades restantes en presencia de ácido okadaico 1 nM y 1  $\mu$ M, respectivamente. Las actividades de la proteína fosfatasa se informaron como nmol de Pi liberado por minuto/mg de proteína total.

Ensayo de citotoxicidad: Todos los reactivos utilizados en el tratamiento de células NHBE se examinaron para determinar la citotoxicidad midiendo la liberación total de lactato deshidrogenasa de las células. El ensayo se llevó a cabo utilizando el kit Promega Cytotox 96 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los experimentos se realizaron con reactivos en concentraciones no citotóxicas.

Análisis estadístico: Los datos se analizaron para determinar su importancia mediante el análisis unidireccional de la varianza con las correcciones posteriores a la prueba de Bonferroni. Las diferencias entre los tratamientos se consideraron significativas a p<0.05. Aislamiento de PMN a partir de sangre canina: Los pasos involucrados en el aislamiento de PMN incluyen la recolección de 10 ml de sangre anticoagulada con ACD. Luego se depositan 5 ml en medio de aislamiento de PMN de 3.5 ml mientras se asegura de que el medio de aislamiento de PMN (IM) esté a temperatura ambiente (RI). Luego, la sangre se centrifugó a temperatura ambiente durante 30', 550 X g a 1700 RPM. La banda blanca inferior se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml (CCFT). A continuación, se agregaron 2V de HESS con suero fetal bovino (PBS) al 10% y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10', 400 X g a 1400 RPM. El sedimento se resuspendió luego en 5 ml 1-HESS con PBS. La suspensión celular se añadió a 50 ml de CCFT que contenía 20 ml de NH<sub>4</sub>Cl al 0.88% enfriado con hielo y se invirtió de dos a tres veces. El producto resultante se centrifugó durante 10', 800 X g a 2000 RPM, luego se aspiró y se resuspendió en 5 ml de HBSS con FBS. La preparación se examinó mediante recuento y citorrotación y, preferiblemente, para la sangre completa, el número de células debe estar entre 10<sup>9</sup>-10<sup>11</sup> células y para las PMN, el número de células debe estar entre 2-4 x 10<sup>7</sup> células. Ver en general, Wang et al., J. Immunol., "Cambios inducidos por los neutrófilos en las propiedades biomecánicas de las células endoteliales: roles de ICAM-1 y especies reactivas de oxígeno", 6487-94 (2000). Ensayo de enzima colorimétrica MPO: Las muestras se analizaron para determinar la actividad de la MPO en placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pozos utilizando un kit ELISA tipo sándwich (R & D Systems, Minneapolis, Minn.). En resumen, se mezclan 20 microlitros de muestra con 180 microlitros de mezcla de sustrato que contiene fosfato de potasio 33 mM, pH 6.0, Triton X-100 al 0.56%, peróxido de hidrógeno 0.11 mM y diclorhidrato de O-Diannisidina 0.36 mM en un pozo de microtitulación individual. Las concentraciones finales en la mezcla

de ensayo son: fosfato de potasio 30 mM, pH 6.0, Triton X-100 al 0.05%, peróxido de hidrógeno 0.1 mM y dihidrocloruro de O-dianisidina 0.32 mM. Después de mezclar, la mezcla de ensayo se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y la actividad de la enzima MPO se determinó espectrofotométricamente a 550 nanómetros. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

## 5 Ejemplo 1.

Estudios de secreción de mediadores inflamatorios.

Se utilizaron cuatro tipos o modelos de leucocitos diferentes que secretan contenidos de gránulos específicos en respuesta a la activación de PKC inducida por el éster forbol. Se aislaron neutrófilos de sangre humana y se evaluó la liberación in vitro de MPO por estas células. También se evaluó la liberación de mediadores inflamatorios unidos a la membrana de líneas celulares de leucocitos humanos comercialmente disponibles. Se utilizó el clon 15 de la línea celular promielocítica humana HL-60 para evaluar la secreción de EPO (Fischkoff SA. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. *Leuk Res* 1988; 12: 679-686; Rosenberg HF, Ackerman SJ, Tenen DG. Human eosinophil cationic protein: molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. *J Exp Med* 1989; 170: 163-176; Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF. Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 49-54; Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil desgranulation and superoxide anion generation. *Exp Biol Med* 2002; 227: 645-651). La línea celular de leucemia monocítica U937 se usó para evaluar la secreción de lisozima (Hofft, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Struebe M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170: 5276-5280; Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-577). La línea celular NK-92 del asesino natural del linfocito utilizada para evaluar la liberación de granzima (Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8: 652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92 *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 369-383; Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104: 183-190). En todos los casos, las células se preincubaron con un intervalo de concentraciones de un péptido sintético idéntico al término N de MARCKS de 24 aminoácidos (péptido de secuencia N-terminal miristoilado MANS); MA-GAQFSFSTAGGAAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1) en donde MA es miristoilo unido a la amina N-terminal del péptido por un enlace amida, o un péptido de control de sentido erróneo (RNS: péptido de secuencia N-terminal aleatorio; MA-GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF, SEQ ID NO: 232) que consta de los mismos 24 aminoácidos pero dispuestas en una secuencia de orden aleatorio que posee menos del 13% de identidad de secuencia con la secuencia del péptido MANS. Alternativamente, las células se trataron previamente con uno de los péptidos truncados sintéticos enumerados en la Tabla 3 a continuación.

En cada uno de los tipos de células, MANS, pero no RNS, se atenúa la liberación de mediadores inflamatorios de una manera dependiente de la concentración. Un curso de tiempo útil de observación es de 0.5-3.0 horas. Los resultados son consistentes con la región N-terminal de la proteína MARCKS que está involucrada en las vías intracelulares que conducen a la desgranulación de los leucocitos.

40 Aislamiento de neutrófilos humanos: Estos estudios fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional (IRB) de estudios humanos. Los neutrófilos humanos se aislaron como se describió anteriormente (véase Takashi S, Okubo Y, Horie S. Contribution of CD54 to human eosinophil and neutrophil superoxide production. *J Appl Physiol* 2001; 91: 613-622) con ligeras modificaciones. En resumen, se obtuvo sangre venosa heparinizada de voluntarios sanos normales, diluidos con RPMI-1640 (Cellgro; Mediatech, Inc., Herndon, VA) en una proporción de 1:1, en capas sobre un Histopaque (densidad, 1.077 g/ml; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) y centrifugó a 400 g durante 20 min a 4°C. Las células sobrenadantes y mononucleares en la interfaz se eliminaron cuidadosamente y los eritrocitos en el sedimento se sometieron a lisis en agua destilada enfriada. Los granulocitos aislados se lavaron dos veces con solución de sales balanceadas de Hanks (HBSS) y se resuspendieron en HBSS en hielo. Los neutrófilos utilizados para los experimentos tenían una pureza >98% con una contaminación <2% por eosinófilos, y la viabilidad fue >99% según lo determinado por la exclusión del colorante azul tripán.

Medición de la actividad de la MPO de los neutrófilos liberados: Para la medición de la liberación de la MPO, los neutrófilos humanos purificados suspendidos en HBSS se dividieron en alícuotas a  $4 \times 10^6$  células/ml en tubos de 15 ml y se preincubaron con 50 o 100  $\mu$ M de MANS, RNS o uno de los péptidos de invención durante 10 min a 37°C. Las células fueron estimuladas con 100 nM forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) por hasta 3 horas. Se estableció una referencia de control (referencia de control de PMA) utilizando neutrófilos humanos purificados suspendidos en HBSS en alícuotas a  $4 \times 10^6$  células/ml en tubos de 15 ml y estimulados con fenol 12-miristato 13-acetato (PMA) 100 nM en ausencia de un péptido de prueba durante los mismos períodos de tiempo. La reacción se terminó colocando los tubos en hielo y centrifugando a 400 g durante 5 minutos a 4°C.

60 La actividad de la MPO en el sobrenadante celular se analizó con tetrametilbencidina (TMB) basada en una técnica previamente establecida (Abdel-Latif D, Steward M, Macdonald DL, Francis GA, Dinauer MC, Lacy P. . *Blood* 2004; 104:

832-839). En resumen, se agregaron 100 µL de solución de sustrato TMB a 50 µL de sobrenadantes celulares o MPO humana estándar (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) en una microplaca de 96 pozos seguida de incubación a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se terminó mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplaca espectrofotométrico (VERSA max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

## 5 Estudios de cultivo de leucocitos.

Tres tipos de líneas celulares de leucocitos humanos, específicamente la línea celular promielocítica HL-60 clone 15, la línea celular monocítica U937 y la línea celular NK-92 del asesino natural de linfocitos se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD). Se mantuvieron 15 células del clon HL-60 (ATCC CRL-1964) en un medio que consiste en RPMI 1640 con L-glutamina suplementada con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Gibco; Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 50 UI/ml penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y 25 mM de regulador HEPES, pH 7.8, a 37°C en una atmósfera que contiene 5% de CO<sub>2</sub>. La diferenciación final a un fenotipo de tipo eosinófilo se inició cultivando células a 5 x 10<sup>5</sup> células/ml en el medio anterior que contenía ácido butírico 0.5 mM (Sigma-Aldrich Co.) durante 5 días como se describió previamente (Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF. Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 49-54; Tiffany HL, Alkhatib G, Combadiere C, Berger EA, Murphy PM, CC chemokine receptors 1 and 3 are differentially regulated by IL-5 during maturation of eosinophilic HL-60 cells. *J Immunol* 1998; 160: 1385-1392). Se cultivaron células U937 (ATCC CRL-1593.2) a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en medio completo que consiste en RPMI 1640 con L-glutamina suplementada con FBS al 10%, penicilina 50 UI/ml y estreptomina 50 µg/ml. Las células NK-92 (ATCC CRL-2407) se mantuvieron en medio alfa-MEM (Sigma-Aldrich Co.) suplementado con FBS al 20%, 100 U/ml de interleucina-2 (IL-2) (Chemicon International, Inc., Temecula, CA), 5 x 10<sup>-5</sup> M de 2-mercaptoetanol, 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina a 37°C en una atmósfera que contiene 5% de CO<sub>2</sub>. La morfología celular se evaluó mediante la evaluación de células teñidas con Wright-Giemsa. La viabilidad de las células recolectadas para los experimentos se evaluó mediante exclusión con azul de tripano y se utilizaron poblaciones de células con una viabilidad >95%.

Incubación de células para ensayos de desgranulación.

Las células del clon 15, U937 y NK-92 de HL-60 se lavaron y se resuspendieron a 2.5 x 10<sup>6</sup> células/ml en RPMI-1640 libre de rojo fenol (Cellgro; Mediatech, Inc.) para todos los ensayos de desgranulación. Se preincubaron partes alícuotas de células en tubos de 15 ml con concentraciones indicadas de MANS, RNS o un péptido de prueba durante 10 min a 37°C. Luego, las células se estimularon con PMA durante hasta 2 horas. Se estableció una referencia de control (referencia de control de PMA) para cada tipo de célula utilizando el clon 15 de HL-60, las células U937 y NK-92, respectivamente, que se lavaron y se resuspendieron a 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml en RPMI-1640 libre de rojo de fenol y se estimularon con PMA pero en ausencia de MANS, RNS o un péptido de prueba durante los mismos periodos de tiempo. La reacción se terminó colocando los tubos en hielo y centrifugando las células a 400 g durante 5 minutos a 4°C. Para las mediciones de la MPO liberada de los neutrófilos y la lisozima liberada de las células U937, pudimos cuantificar la secreción utilizando como estándar la MPO humana y la ovoalbúmina de clara de huevo, respectivamente. Para la EPO liberada de las células del clon 15 de HL-60 y para la granzima liberada de las células NK-92, no se disponía de estándares para su uso para la cuantificación. Por lo tanto, se midieron los niveles de EPO y granzima tanto liberados como intracelulares (de células lisadas), y la EPO y granzima liberados se expresaron como un porcentaje del total (intracelular y liberado) para cada uno. Para medir la EPO intracelular en las células del clon 15 de HL-60 y la granzima intracelular en las células NK-92, se tomaron partes alícuotas apropiadas de tritonX-100 lisado al 0.1% para la cuantificación de proteínas granulares intracelulares como se describe a continuación. Todos los tratamientos se expresaron como porcentaje de control para minimizar la variabilidad entre los cultivos.

Medición de la liberación de EPO HL-60. La actividad de la EPO liberada por las células del clon 15 de HL-60 se analizó utilizando TMB de acuerdo con una técnica establecida previamente (Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez JR, Man SF, Moqbel R. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils (*Blood* 1999; 94: 23-32). Por lo tanto, se agregaron 100 µL de solución de sustrato TMB a 50 µL (µL = microlitros) de muestra en una microplaca de 96 pozos y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos (min = minutos). La reacción se terminó mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M y se leyó la absorbancia a 450 nm (nm = nanómetros) en un lector de microplaca espectrofotométrica. La cantidad de EPO secretada se expresó como porcentaje del contenido total, utilizando la cantidad obtenida en el mismo número de células lisadas con Triton X-100.

## 50 Medición de la secreción de lisozima de monocitos.

La lisozima secretada por las células U937 se midió usando un ensayo espectrofotométrico como se describió anteriormente (Balboa MA, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170: 5276-5280) con leve modificación. Así, se mezclaron 100 µL de muestra con 100 µL de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich Co.) (0.3 mg/ml en regulador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0) en una microplaca de 96 pozos. La disminución de la absorbancia a 450 nm se midió a temperatura ambiente. Se construyó una curva de calibración utilizando lisozima blanca de huevo de gallina (EMD Biosciences, Inc.) como estándar.

Medición de la secreción de granzimas de células NK.

La granzima secretada a partir de células NK-92 se ensayó midiendo la hidrólisis del N $\alpha$ -benciloxycarbonil-L-lisina tiobencil éster (BLT) esencialmente como se describió anteriormente (Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. J Immunol Methods 1987; 104: 183-190). En resumen, se transfirieron 50  $\mu$ L de sobrenadante a una placa de 96 pozos y 150  $\mu$ L de solución BLT (0.2 mM BLT; EMD Biosciences, Inc., y DTNB 0.22 mM; Sigma-Aldrich Co.) (mM = milimolar) en solución salina regulada con fosfato (PBS, pH 7.2) se añadió al sobrenadante. La absorbancia a 410 nm se leyó después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron como porcentaje del contenido total de enzimas celulares, utilizando la cantidad obtenida en el mismo número de células lisadas con Triton X-100.

Análisis estadístico.

La importancia estadística de las diferencias entre los diversos grupos de tratamiento se evaluó con ANOVA de una vía. Los valores de  $p < 0.05$  se tomaron como significativos.

Inhibición de la liberación de MPO de los neutrófilos humanos

Se encontró que la PMA 100 nM (como un estimulador de la liberación de mediadores inflamatorios) incrementó la liberación de MPO de neutrófilos humanos aproximadamente tres veces en comparación con el nivel de control a los 30 minutos en la referencia de control de PMA, la liberación de MPO aumentó a aproximadamente 5 a 6 veces después de 3 horas. A los 30 minutos, en relación con la actividad de MPO de control como PMA ausente al 100% y PMA ausente más MANS, RNS o péptido de prueba, la actividad de MPO de la referencia de control de PMA fue de aproximadamente el 275%, la PMA más el MANS de 50  $\mu$ M fue de alrededor del 275% y 100  $\mu$ M MANS fue aproximadamente 305%. Por lo tanto, el péptido MANS no tuvo ningún efecto detectado a los 30 min. Sin embargo, a las 1 h, la concentración más alta de MANS (100  $\mu$ M) tuvo un efecto inhibitorio significativo (medido en aproximadamente el 260% del control) o una reducción de aproximadamente el 25% en la liberación de MPO en comparación con el nivel de referencia de control de PMA (que se midió en aproximadamente el 340% de control). La muestra MANS 50  $\mu$ M midió aproximadamente el 290% del control o aproximadamente el 15% de reducción en relación con la referencia del control PMA. A las 2 horas y persistiendo a las 3 horas, el péptido MANS atenuó significativamente la actividad de la MPO de una manera dependiente de la concentración. A las 2 horas, la actividad de la MPO de referencia de control de PMA fue aproximadamente 540% del control, la MANS 50  $\mu$ M (que mide aproximadamente el 375% de control) causó una reducción de aproximadamente el 30% de la liberación de MPO frente a la referencia de control de PMA; y MANS 100  $\mu$ M (que mide aproximadamente el 295% del control) causó una reducción de aproximadamente el 45% de la liberación de MPO frente a la referencia de control de PMA. A las 3 horas, la actividad de la MPO de referencia de control de PMA fue aproximadamente el 560% del control, MANS 50  $\mu$ M (que mide aproximadamente el 375% del control) causó una reducción de aproximadamente el 33% de la liberación de MPO frente a la referencia de control de PMA; 100  $\mu$ M MANS (que mide aproximadamente el 320% del control) causó una reducción de aproximadamente el 40% de la liberación de MPO frente a la referencia de control de PMA. El péptido RNS no afectó la liberación de MPO inducida por PMA en ninguno de los puntos temporales o concentraciones analizadas. Los datos presentados en la tabla a continuación representan una concentración de péptidos de prueba de 100  $\mu$ M y una incubación de dos horas con PMA 100 nM.

Inhibición de la liberación de EPO a partir de células HL-60 La actividad de EPO en el sobrenadante de las células del clon 15 de HL-60 se mejoró significativamente 1 y 2 horas después de la estimulación con PMA. A la hora, con respecto a la actividad de EPO del control como 100%, la referencia de control de PMA se midió en aproximadamente 110%; la muestra que contiene MANS 10  $\mu$ M se midió a aproximadamente el 95% para proporcionar una reducción de aproximadamente el 15% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA; la muestra que contiene MANS 50  $\mu$ M se midió a aproximadamente el 78% para dar una reducción de aproximadamente el 30% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA; y la muestra que contiene MANS 100  $\mu$ M se midió a aproximadamente el 65% para proporcionar una reducción de aproximadamente el 40% en la actividad de EPO con respecto a la referencia de control de PMA. A las 2 horas, en relación con la actividad de EPO del control como 100%, la referencia de control de PMA se midió en aproximadamente 145%; la muestra que contiene MANS 10  $\mu$ M se midió a aproximadamente 130% para dar una reducción de aproximadamente el 10% en la actividad de EPO con respecto a la referencia de control de PMA; la muestra que contiene MANS 50  $\mu$ M se midió a aproximadamente el 70% para proporcionar una reducción de aproximadamente el 50% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA; y la muestra que contiene MANS 100  $\mu$ M se midió a aproximadamente el 72% para dar una reducción de aproximadamente el 50% en la actividad de EPO con respecto a la referencia de control de PMA. Por lo tanto, en 1 y 2 horas, MANS a 50 o 100  $\mu$ M atenuó significativamente la liberación de EPO. El péptido RNS no afectó la liberación de EPO potenciada con PMA en ninguno de los puntos temporales o concentraciones analizadas. Los datos presentados en la tabla a continuación representan una concentración de 50  $\mu$ M de péptidos de prueba y una incubación de dos horas con PMA 100 nM.

Inhibición de la liberación de lisozima a partir de células U937 La secreción de lisozima por las células U937 se incrementó mediante la estimulación con PMA 1 h después de la incubación, y aumentó aún más a las 2 h. A la hora, en relación con la secreción de lisozima por las células U937 del control como 100%, la referencia de control de PMA se midió en aproximadamente 210%; la muestra que contiene 10  $\mu$ M MANS se midió a aproximadamente el 170% para proporcionar una reducción de aproximadamente el 20% en la secreción de lisozima por células U937 en relación con la referencia de control de PMA; la muestra que contiene MANS 50  $\mu$ M se midió a aproximadamente el 170% para proporcionar una reducción de aproximadamente el 20% en la secreción de lisozima por las células U937 en relación con la referencia de control de PMA; y la muestra que contiene MANS 100  $\mu$ M se midió a aproximadamente 115% para dar una reducción de

aproximadamente 45% en la secreción de lisozima por células U937 con respecto a la referencia de control de PMA. A las 2 horas, en relación con la secreción de lisozima por las células U937 del control como 100%, la referencia de control de PMA se midió en aproximadamente 240%; la muestra que contiene MANS 10 µM se midió a aproximadamente el 195% para proporcionar una reducción de aproximadamente el 20% en la secreción de lisozima por células U937 en relación con la referencia de control de PMA; la muestra que contiene MANS 50 µM se midió a aproximadamente 185% para dar una reducción de aproximadamente 25% en la secreción de lisozima por células U937 con respecto a la referencia de control de PMA; y la muestra que contiene MANS 100 µM se midió en aproximadamente 140% para dar una reducción de aproximadamente 40% en la secreción de lisozima por células U937 con respecto a la referencia de control de PMA. Por lo tanto, la secreción de lisozima se atenuó significativamente en 1 y 2 horas después de la estimulación con 100 µM de MANS, pero no tanto con 50 o 10 µM de MANS. El péptido RNS no afectó la secreción de lisozima potenciada con PMA en ninguno de los puntos de tiempo o concentraciones analizadas. Los datos presentados en la tabla a continuación representan una concentración de 50 µM de péptidos de prueba y una incubación de dos horas con PMA 100 nM.

Inhibición de la liberación de granzimas de las células NK-92 Se utilizó la línea celular de linfocitos asesinos naturales NK-92 para evaluar la liberación de granzima (Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8: 652-658, 1994; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 10: 369-383, 2001; Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay (*J. Immunol. Methods* 104: 183-190, 1987).

Medición de la secreción de granzima de células NK: La granzima secretada a partir de células NK-92 se analizó midiendo la hidrólisis del éster tiobencílico de N $\alpha$ -benciloxycarbonil-L-lisina (BLT, EMD Bioscience, Inc.) esencialmente como se describió anteriormente (Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV: A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J. Immunol. Methods* 104: 183-190, 1987). Se transfirió una parte alícuota de 50 µl de sobrenadante a una placa de 96 pozos, y se agregaron 150 µl de solución 0.2 mM de BLT y DTNB 0.22 mM (Sigma-Aldrich Co.) en solución salina regulada con fosfato (PBS, pH 7.2) al sobrenadante. La absorbancia a 410 nm se midió después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron como porcentaje del contenido total de enzimas celulares, utilizando la cantidad obtenida en el mismo número de células lisadas con Triton X-100. Debido a que la granzima estándar de las células NK-92 no estaba disponible para el uso para la cuantificación, medimos los niveles de granzima tanto liberados como intracelulares (de las células lisadas), y expresamos la granzima liberada como un porcentaje del total (intracelular y liberado) para cada una. Para medir la granzima intracelular a partir de células NK-92, se tomaron partes alícuotas apropiadas de células lisadas con Triton X-100 al 0.1% para la cuantificación de la enzima como se describe anteriormente. Todos los datos se expresan como porcentaje de control para minimizar la variabilidad entre culturas. Los datos presentados en la tabla a continuación representan una concentración de 50 µM de péptidos de prueba y una incubación de dos horas con PMA 100 nM.

35 Citotoxicidad

Debido a que ninguno de los tratamientos estándar generó una respuesta tóxica en las células, según lo evaluado por la retención/liberación de LDH (datos no mostrados) (véase también Park J-A, He F, Martin LD, Li Y, Adler KB. Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from human bronchial epithelial cells in vitro via a PKC $\delta$  - mediated mechanism. *Am J Pathol* 2005; 167: 651-661).

40 En experimentos preliminares, los siguientes péptidos que se presentan en la tabla siguiente demuestran el porcentaje respectivo de inhibición de la liberación de MPO de los neutrófilos humanos, de la EPO de las células del clon 15 de HL-60, de la lisozima de las células U937 y de la granzima de las células NK-92, en donde MA- significa la presencia de un grupo sustituyente de miristoilo en la posición alfa-N-terminal del péptido; Ac-significa la presencia de un grupo sustituyente acetilo en la posición alfa-N-terminal del péptido; H significa que no hay grupo unido al péptido; y NH<sub>2</sub> significa la presencia de una amida en la posición C-terminal. Los datos de inhibición se promedian a partir de múltiples experimentos. La solubilidad cualitativa de los péptidos en solución salina 0.5 N a pH 6.5 se da en mg/ml en la Tabla 3 a continuación. El cambio de la unidad estructural química N-terminal de un grupo miristoilo puede conducir a cambios en la solubilidad de los péptidos descritos en el presente documento en medios acuosos. Por ejemplo, cambiar el grupo miristoilo a un grupo acetilo da como resultado el aumento de la solubilidad acuosa que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de las solubilidades de los ensayos de inhibición enzimática para péptidos representativos y péptidos sustituidos

SEQ ID NO.:	N-1	Secuencia de aminoácido	C-2	% de Inhibición				mg/mL
				EPO	Lisozima	MPO	Granzima	Solubilidad <sup>3</sup>
219	Ac	AKGE		87.6	7.2			>200

Tabla 3. Resultados de las solubilidades de los ensayos de inhibición enzimática para péptidos representativos y péptidos sustituidos

SEQ ID NO.:	N-1	Secuencia de aminoácido	C-2	% de Inhibición				mg/mL
				EPO	Lisozima	MPO	Granzima	Solubilidad <sup>3</sup>
45	Ac	AKGEAAAERPGEAAVA		72.3	34.3			
37	Ac	GAQFSKTAAKGEEAAE		56.6	8.4			
239	Ac	GAQFSKTAAAGE		55.8	37.2			>50
248	Ac	GAQFSKT AAA		55.2	28.3			>100
91	Ac	AAAERPGEAAVA		51.2	29.5			
11	Ac	GAQFSKTAAKGEEAAAERPGE		48.8	0.0			
79	Ac	GAQFSKTAAKGE		46.7	43.3			>100
153	Ac	RPGEAAVA		45.8	0.0			
219	Ac	AKGE	NH2	45.6	26.8			>200
93	Ac	AQFSKTAAKGE	NH2	42.8	51.8			>90
141	Ac	SKTAAKGE	NH2	42.2	0			>200
241	Ac	GAQFSKTAAKGA		40.9	24.1			>50
143	Ac	TAAKGEEA		40.4	0.5			>230
251	Ac	AAGE		39.1	36.9			>200
106	Ac	GAQFSKTAAK		35.7	41.2	25.3		>100
249	Ac	GAQFSATAAA		35.7	3.2			<10
1	Ac	GAQFSKTAAKGEEAAAERPGE AAVA		33.7	39.8			> 250
121	Ac	GAQFSKT AA		33.3	28.9			>20
106	Ac	GAQFSKTAAK (todo d)		26.9	8.9	40.0		>100
124	Ac	FSKTAAKGE	NH2	25.3	56.7			>100

ES 2 725 599 T3

Tabla 3. Resultados de las solubilidades de los ensayos de inhibición enzimática para péptidos representativos y péptidos sustituidos

SEQ ID NO.:	N-1	Secuencia de aminoácido	C-2	% de Inhibición				mg/mL
				EPO	Lisozima	MPO	Granzima	Solubilidad <sup>3</sup>
79	Ac	GAQFSKTAAKGE	NH2	24.7	38.6	26.5		>60
108	Ac	QFSKTAAKGE	NH2	15.7	60.7			>150
179	Ac	AAKGEEA		10.6	9.2			>150
159	Ac	KTAAKGE	NH2	0	24.3			>200
137	Ac	GAQFSKTA		0	0			>200
79	H	GAQFSKTAAKGE				27.9		>60
1	MA	GAQFSKTAAKGEAAAERPGE AAVA		46.1	40.8	31.2	76.0	<5.0
106	MA	GAQFSKTAAK		37.4	56.6			>10
11	MA	GAQFSKTAAKGEAAAERPGE		33.6	99			
179	MA	AAKGEEA		31.4	28.6			<1.0
37	MA	GAQFSKTAAKGEAAAE		30.3	99			>2.0
79	MA	GAQFSKTAAKGE		25.2	85.2	43.2		>2.0
91	MA	AAAERPGEAAVA		21.6	98			<20
45	MA	AKGEAAAERPGEAAVA		18.1	98			>80
153	MA	RPGEAAVA		0	99			
15	MA	SKTAAKGEAAAERPGEAAVA		0	99			>80
143	MA	TAAKGEEA		0	80.2			<1.0
219	MA	AKGE		0	28.6			<1.0
232	MA	GTAPAAEGAGAEVKRASAEA KQAF		0	0	0	29.5	>15

Tabla 3. Resultados de las solubilidades de los ensayos de inhibición enzimática para péptidos representativos y péptidos sustituidos

SEQ ID NO.:	N- <sup>1</sup>	Secuencia de aminoácido	C- <sup>2</sup>	% de Inhibición				mg/mL
				EPO	Lisozima	MPO	Granzima	Solubilidad <sup>3</sup>
234	MA	GAQFSKTKAKGE				65.2		>3.0

<sup>1</sup>N- = grupo N-terminal  
<sup>2</sup>C- = grupo C-terminal  
<sup>3</sup> Salino 0.5 N, pH 6.5

Ejemplo 2.

Inhibición in vivo de la inflamación pulmonar inducida por lipopolisacáridos (LPS) por MANS y péptidos relacionados

Este ejemplo se realizó esencialmente según los métodos descritos por Cox, G, Crossley, J. and Xing, Z.; El engrosamiento de macrófagos de los neutrófilos apoptóticos contribuye a la resolución de la inflamación pulmonar aguda in vivo; Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12: 232-237, 1995; Hirano S., Quantitative time-course profiles of bronchoalveolar lavage cells following intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice, Ind. Health 35: 353-358, 1997; y Ulich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H and del Castillo, J. Am. J. Pathol. 138: 1485-1496, 1991. Así, se obtuvieron ratones hembra CD1 de seis a siete semanas de edad que pesaban de 15 a 20 gramos en los laboratorios Charles River y se alojaron en grupos de 5 ratones por jaula. Los animales recibieron dieta estándar para roedores y agua filtrada a voluntad. Los animales se alojaron según las pautas prescritas por los NIH a temperatura estándar (64° a 79°F) y humedad relativa de 30 a 70%.

Se trataron cinco grupos de tratamiento de ratones, con 5 animales en cada grupo, con PBS seguido de PBS, con PBS seguido de LPS, con péptido MANS (miristolado) seguido de LPS, con péptido acetilado de la SEQ ID NO: 1, seguido de LPS, o con péptido acetilado de la SEQ ID NO: 106, seguido de LPS.

Pretratamiento con instilación de péptidos intranasales: Un péptido de la invención que se evaluó in vivo por su capacidad para inhibir o reducir la inflamación pulmonar inducida por LPS se disolvió en PBS a una concentración de 1 mM. Los animales, anestesiados con isoflurano al 0.8% por inhalación, se pretrataron con 2x 10 µL de bolo intranasal de la solución de péptido en una fosa nasal 30 minutos antes de la posterior instilación con LPS.

Instilación de LPS intranasal: Lipopolisacárido (LPS) Endotoxina (Escherichia coli Serotipo 011: endotoxina derivada B4; Sigma, St. Louis, MO; consulte la hoja de información del producto Sigma L4130 titulada Lipopolisacáridos de Escherichia coli 011:B4) en la solución salina fosfatada (PBS) a 2.500 µg/mL. Para exponer a los animales a la endotoxina, se administró un bolo intranasal de 10 µL de 2.500 µg/ml de solución de endotoxina a los animales que habían sido anestesiados con isoflurano al 0,8% por inhalación. El bolus de 10 µL se aplicó en una fosa nasal. Los animales se monitorizaron para detectar respiración respiratoria, letargo y disminución de la ingesta de agua/alimentos después de las instilaciones de endotoxinas.

Lavado broncoalveolar (BAL): Seis horas después de la última instilación, los animales se anestesiaron (90 mg/kg de nembutal) y se sacrificaron por exanguinación. El pulmón se lavó en serie 2 veces con alícuotas de 1.0 ml de PBS. El fluido BAL recogido se centrifugó para eliminar las células para su posterior conteo y análisis diferencial. Se utilizó líquido de lavado recuperado para el análisis de proteínas totales, mieloperoxidasa (MPO), LDH y hemoglobina.

Análisis: Se utilizaron alícuotas del fluido BAL inmediatamente para analizar los niveles de LDH, proteína total o hemoglobina utilizando el analizador COBAS Fara (analizador automático COBAS FARA II; Roche Diagnostic Systems Inc., Montclair, NJ). Una alícuota de fluido BAL se congeló a -80°C para la cuantificación posterior de mieloperoxidasa (MPO) con un ensayo ELISA específico para ratones (Cell Sciences, Inc., Canton, Mass). Los datos de BAL se analizaron mediante técnicas estándar para examinar las diferencias entre los grupos de control y tratamiento. Los resultados que demuestran la inhibición o reducción de la inflamación por el péptido de prueba se proporcionan en las siguientes tablas.

Tabla 4. Valores promedio de los marcadores de inflamación en presencia del péptido MANS, MA-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA, SEQ ID NO: 1

Régimen de tratamiento	Total de células contadas	Total de neutrófilos contados	% de neutrófilos de células totales	MPO (ng/mL)	Proteína total (ug/ml)	LDH (unidades/L)	Hb (g/dl)
PBS/PBS n=5	157.020	29317	18.7	3.28	125.60	68.20	0.00
PBS/LPS n=5	264.200	110.061	41.7	28.98	272.40	60.40	0.19
MANS/ PS n=7	208.457	64.481	30.9	9.49	175.00	68.57	0.05

Tabla 5. Valores promedio de marcadores de inflamación en presencia de un análogo acetilado N-terminal del péptido MANS, Ac-GAQFSKTAAGGAAAERPGEAAVA, SEQ ID NO: 1

Régimen de tratamiento	Total de células contadas	Total de neutrófilos contados	% de neutrófilos de células totales	MPO (ng/mL)	Proteína total (µg/mL)	LDH (unidades/L)	Hb (g/dL)
PBS/PBS n=5	89.440	19.770	22.1	5.45	230.6	84.0	0.00
PBS/LPS n=5	251.360	164.578	65.5	37.90	153.4	89.9	0.01
Ac-SEQ ID NO.:1/LPS n=5	254.400	105.499	41.47	30.79	182.75	74.5	0.01

Tabla 6. Valores promedio de los marcadores de inflamación en presencia de péptido acetilado Ac-GAQFSKTAAK, SEQ ID NO: 10.6

Régimen de tratamiento	de	Recuento total de células	de	Recuento total de neutrófilos	% de neutrófilos de los recuentos totales	MPO (ng/mL)	Proteína Total (µg/mL)	LDH (unidades/L)	Hb (g/dL)
PBS/PBS n=5		312.620		66.521	21.3	4.88	113.8	61.80	0.00
PBS/LPS n=5		327.680		80.077	24.4	7.19	116.4	78.20	0.00
Ac-SEQ ID NO.:106/LPS n=5		305.688		9.170	3.0	1.50	131.0	106.86	0.00

5 Tabla 7. Inhibición de marcadores de inflamación por el péptido MANS (Myr-SEQ ID ID: 1), péptidos de prueba (Ac-GAQFSKTAAGGAAAERPGEAAVA), SEQ ID NO: 1 y Ac-GAQFSKTAAK, SEQ ID NO: 106, relativa a PBS/Tratamiento LPS:

Régimen de tratamiento	Inhibición de la migración de neutrófilos	Inhibición de MPO
MANS/LPS	41.4 %	67.2%
SEQ ID NO:1/LPS	35.9 %	18.75%
Ac-SEQ ID NO. 106/LPS	88.5%	79.1%

10 PBS/PBS indica que solo se administró el control de PBS, y no se agregó endotoxina LPS para estimular la migración de neutrófilos quimiotácticos; PBS/LPS indica que se agregó LPS (endotoxina) para estimular la migración de neutrófilos quimiotácticos; MANS/LPS indica pretratamiento con péptido MANS en PBS seguido de estimulación con LPS para inducir la migración de neutrófilos. El porcentaje de neutrófilos en el recuento total de células en los grupos de tratamiento con LPS se redujo del 41.7% al 30.9% mediante el tratamiento con el péptido MANS; del 65.5% al 41.47% por tratamiento con

el péptido Ac-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA, SEQ ID NO: 1; del 24.4% al 3.0% por tratamiento con el péptido Ac-GAQFSKTAAK, SEQ ID NO: 106. Los niveles de MPO medidos en los grupos de tratamiento con LPS se redujeron de 28.98 ng/mL a 9.49 ng/mL por tratamiento con péptido MANS; de 37.9 ng/ml a 30.79 ng/ml por tratamiento con el péptido con la SEQ ID NO: 1 acetilada y de 7.19 ng/ml a 1.50 ng/ml por tratamiento con el péptido con la SEQ ID NO: 106 acetilada.

5 Ejemplo 3. Modelo de ratón de la EPOC inducida por ozono

El estrés oxidativo por irritantes químicos como el ozono es una característica ampliamente reconocida de la enfermedad respiratoria obstructiva crónica (EPOC). Véase: Repine JE, Bast A, Lankhorst I, and the Oxidative Stress Study Group, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156: 341-357, 1997; y también Harkema JR and Hotchkiss JA, Toxicology Letters, 68: 251-263, 1993. Se obtuvieron ratones hembra Balb/C de diez semanas de edad de los laboratorios Charles River y se alojaron según las pautas de los NIH en grupos de 5 por jaula. Los animales recibieron dieta estándar para roedores y agua filtrada a voluntad. Se anestesiaron tres grupos de ratones, 5 animales en cada grupo de tratamiento, mediante inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (20 mg/kg) y luego se pretrataron mediante administración intratraqueal con 25 µl de PBS solo o solución de péptido MANS 1.0 mM en PBS, o una solución de 1.0 mM de un péptido de fragmento MANS acetilado Ac-GAQFSKTAAK designado como SEQ ID NO: 106 acetilado en PBS. Después de 30 minutos, los animales se colocaron en la cámara adecuada hecha a medida para la exposición al ozono o al aire forzado. Los animales se expusieron al ozono durante 2 horas (a concentraciones de ozono de 1-10 ppm mediante un método ligeramente modificado descrito por Haddad et al, 1995. (Haddad E-B, Salmon M, Sun J, Liu S, Das A, Adcock I, Barnes PJ and Chung KF, FEBS Letters, 363: 285-288, 1995). El ozono se generó utilizando un aparato generador de ozono modelo OL80F/B de OzoneLab, Burton, Columbia Británica, Canadá. La concentración de ozono se controló continuamente utilizando un Teledyne. Analizador fotométrico 03 (modelo 400E, Teledyne Instruments, City of Industry, CA). Dos grupos adicionales de ratones, cada uno sin ningún tratamiento previo, fueron expuestos al ozono en las mismas condiciones o expuestos al aire forzado en condiciones similares al grupo de tratamiento con ozono, pero sin ozono. Después de la exposición, los animales se sacrificaron por desangrado y los pulmones se lavaron en serie 2 veces con alícuotas de 1.0 ml de PBS. El líquido de lavado broncoalveolar (BAL) recogido se centrifugó para eliminar las células para su posterior conteo y análisis diferencial. Se utilizó líquido de lavado recuperado para la proteína y análisis adicional de IL-6, IFNγ y KC (análogo de IL-8 murino) mediante un ensayo ELISA (kits de ensayo obtenidos de R&D Systems, Minneapolis, MN). El porcentaje de inhibición de la migración de neutrófilos en el fluido BAL en función de los grupos de tratamiento y en relación con un grupo de control tratado con PBS solo se proporciona en la tabla.

30 Tabla 8: Inhibición de la migración de neutrófilos inducida por ozono por el péptido MANS y por el péptido acetilado SEQ ID NO: 106, Ac-GAQFSKTAAK.

Grupo de tratamiento	% de inhibición de la migración de neutrófilos en el fluido BAL
MANS + Ozono	93.0
Ac-SEQ ID NO:106 + Ozono	81.2
PBS + Ozono	No aplica
Aire forzado solo	No aplica

35 Las concentraciones de IL-6 en pg/ml en fluido BAL, en función del tratamiento previo por inyección intratraqueal y el posterior tratamiento con ozono, se obtuvieron de la siguiente manera. Se encontró que los niveles de IL-6 eran: aproximadamente 364.5 pg/ml en un grupo de ratones tratados previamente con péptido MANS y luego expuestos a ozono; aproximadamente 130.4 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con péptido del fragmento MANS acetilado, Ac-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 106), y luego expuestos a ozono; aproximadamente 1041.3 pg/ml en un grupo de ratones tratados previamente con PBS y expuestos a ozono; aproximadamente 43.2 pg/ml en un grupo de ratones expuestos directamente al aire forzado sin ningún tratamiento previo.

40 Las concentraciones de KC en pg/ml en fluido BAL, en función del tratamiento previo por inyección intratraqueal y el posterior tratamiento con ozono, se obtuvieron de la siguiente manera. Se encontró que los niveles de KC eran: aproximadamente 183.6 pg/ml en un grupo de ratones tratados previamente con péptido MANS y luego expuestos a ozono; aproximadamente 159.7 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con péptido del fragmento MANS acetilado, Ac-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 106), y luego expuestos a ozono; aproximadamente 466.6 pg/ml en un grupo de ratones tratados previamente con PBS y expuestos a ozono; aproximadamente 36.3 pg/ml en un grupo de ratones expuestos a aire forzado sin tratamiento previo.

45 Las concentraciones de IFNγ en pg/ml en fluido BAL en función del tratamiento previo por inyección intratraqueal y el tratamiento posterior con ozono se obtuvieron de la siguiente manera. Se encontró que los niveles de IFNγ eran: aproximadamente 7.4 pg/ml en un grupo de ratones tratados previamente con péptido MANS y luego expuestos a ozono; aproximadamente 3.6 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con péptido de fragmento MANS acetilado, Ac-

GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 106), y luego expuestos a ozono; aproximadamente 8.6 pg/ml en un grupo de ratones tratados previamente con PBS y expuestos a ozono; y aproximadamente 5.0 pg/mL en un grupo de ratones expuestos al aire forzado.

5 La administración de ozono a ratones aumentó significativamente los números de células de neutrófilos infiltrados, así como los niveles de IL-6 y KC en el BAL. En comparación con el grupo de control en donde los ratones se trataron previamente con PBS, el grupo se trató previamente con el péptido MANS y el grupo se trató previamente con el péptido acetilado, Ac-GAQFSKTAAK, SEQ ID NO: 106 acetilado. Cada uno exhibió una infiltración reducida de células de neutrófilos en el fluido BAL después de la exposición al ozono (por ejemplo,  $93\% \pm 10\%$  y  $81\% \pm 10\%$ , respectivamente frente a control de PBS). En paralelo, el péptido MANS y el péptido acetilado SEQ ID NO: 106 también disminuyeron notablemente las concentraciones de KC (por ejemplo,  $65.8\% \pm 10\%$  y  $71.3\% \pm 10\%$ , respectivamente, en comparación con el control de PBS) y los niveles de IL-6 (por ejemplo,  $67.8\% \pm 15\%$ , MANS y  $91.3\% \pm 15\%$  de SEQ ID NO: 106 vs. control de PBS) después de la exposición al ozono, pero tuvieron poco efecto sobre los niveles de interferón- $\gamma$ . En conjunto, estos datos evidencian que el péptido MANS y los péptidos SEQ ID NO: 106 acetilados disminuyen notablemente o inhiben la migración de neutrófilos inducida por el ozono en las vías respiratorias, así como disminuyen la quimioquina y la citoquina selectivas. Los niveles de IL-6 en los fluidos BAL de animales pretratados con péptido MANS o péptido acetilado SEC ID NO: 106 mostraron aproximadamente 68% y 91% de inhibición, respectivamente, en comparación con los pretratados con PBS. Además, los niveles de KC en los fluidos BAL de animales pretratados con péptido MANS o péptido acetilado SEQ ID NO: 106 mostraron aproximadamente 65% y 71% de inhibición en comparación con los pretratados con PBS.

20 Ejemplo 4.

Modelo de bronquitis crónica.

El procedimiento es descrito por Voynow JA, Fischer BM, Malarkey DE, Burch LH, Wong T, Longphre M, Ho SB, Foster WM, Neutrophil Elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Fisiol.* 287: L1293-L1302, 2004 y se sigue para desarrollar un modelo de bronquitis crónica en el ratón. Específicamente, la hiperplasia de las células caliciformes, una característica patológica característica de la bronquitis crónica, es inducida por la exposición crónica de ratones a la neutrófilo elastasa (NE) humana instilada en las vías respiratorias.

NE human es aspirada intratraquealmente por ratones Balb/c macho. Un total de 30 ratones (aproximadamente 25-30 g de peso) se obtienen comercialmente de un proveedor como Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME. Los ratones se mantienen en un ciclo diurno de 12 horas, con alimento y agua proporcionados a voluntad. Los animales reciben NE por aspiración orofaríngea los días 1, 4 y 7. Inmediatamente después de la anestesia por inhalación con isoflurano (IsoFlo de Abbott Laboratories y Open-Circuit Gas Anesthesia System de Stoelting), los animales son suspendidos por sus incisivos superiores en una inclinación de  $60^\circ$  y un volumen líquido de NE humana [50 ug (43.75 unidades)/40  $\mu$ L de PBS (Elastin Products, Owensville, MO) se administra con la lengua del animal extendida a la parte distal de la orofaringe. Con la lengua extendida, el animal no puede tragar y el volumen de líquido se aspira en el tracto respiratorio. 7 días después de la última exposición a la NE, cuando la hiperplasia de las células caliciformes que modelan las vías respiratorias en la bronquitis crónica está en su máximo (véase Voynow et al, 2004), se instilan ratones (5 animales por grupo) por vía intratraqueal con 50  $\mu$ l de cualquiera PBS (como control), o 100  $\mu$ M de una solución de péptido MANS, una solución de péptido RNS, o una solución de un péptido tal como péptido acetilado SEQ ID NO: 106 disuelto en PBS. Quince minutos más tarde, se desencadena la secreción de moco mediante la administración de metacolina, utilizando un nebulizador del sistema Buxco para proporcionar un aerosol fino que suministra metacolina a aproximadamente 60 mM durante 3 min. Quince minutos después de la administración de metacolina, los ratones se sacrifican por exposición por inhalación a 100% de gas  $CO_2$ . Histoquímica. Después de las exposiciones descritas anteriormente, los pulmones de los animales se enjuagan para extraer la sangre, luego se inflan con OCT (medio de temperatura de corte óptima (Sakura Finetck, Torrance, CA), medio diluido en solución salina. Los pulmones se sumergen en formaldehído al 10% en PBS durante la noche a  $4^\circ C$ , y procesados a cera de parafina. Las secciones de 5  $\mu$ m se tratan con ácido peryódico Schiff/hematoxilina para teñir mucinas en las vías respiratorias, por ejemplo, como lo describe Singer M, Vargaftig BB, Martin LD, Park JJ, Gruber AD, Li Y, Adler KB, A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a murine model of asthma., *Nature Medicine* 10: 193-196, 2004. Índice histológico de mucosidad. Un índice histológico de mucosidad (Whittaker L, Niu N, Temann U-A, Stoddard A, Flavell RA, Ray A, Homer RJ y Cohn L, , *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27: 593-602, 2002) se realiza en secciones teñidas con AB/PAS que incluyen tanto las vías respiratorias centrales como las periféricas. Las secciones se examinan con un objetivo 10X, y las imágenes se capturan con una cámara digital. Se toma un mínimo de cuatro imágenes representativas de vías respiratorias seccionadas transversalmente o sagitalmente por animal. Solo se analizan las vías respiratorias en las que se puede visualizar e incluir en la imagen la circunferencia completa de las vías respiratorias. Las vías respiratorias que se abren directamente en un espacio alveolar no son incluidas. La extensión de la tinción PAS positiva en cada vía aérea determinada será determinada de manera semicuantitativa por un examinador que no conoce las condiciones de tratamiento para cada sección, utilizando el siguiente sistema de calificación de cinco niveles: grado 0, sin tinción PAS; grado 1, 25% o menos del epitelio de las vías respiratorias tiene tinción PAS; el grado 2, 26-50% del epitelio de las vías respiratorias tiene tinción PAS; grado 3, 51-75% del epitelio de las vías respiratorias tiene tinción PAS; y grado 4, >75% del epitelio de las vías respiratorias tiene tinción PAS. Este sistema de clasificación se usa para calcular la puntuación del índice de moco para cada grupo, y los resultados se presentan como medias  $\pm$  SE.

Todos los resultados se presentan como medios  $\pm$  error estándar (n=5 animales, 10-20 secciones para cada uno). Los niveles de significación se calcularán utilizando ANOVA de una manera seguida de la prueba de Scheffe, utilizando el software SPSS 6.1 (\*= significancia entre los datos con un umbral de  $p < 0.05$ ).

Ejemplo 5.

5 Ensayos in vivo

10 El objetivo del siguiente conjunto de experimentos es establecer los efectos de los péptidos de esta invención después de la administración in vivo, ya sea por instilación local en el sitio de la inflamación o inyección i.v., en la inflamación en comparación con los péptidos de control, como RNS. Dos modelos son útiles para esta determinación: (i) el modelo murino de inflamación de la bolsa de aire y (ii) el modelo murino de peritonitis inducida por tioglicolato. Ambos son modelos de inflamación bien caracterizados en los cuales los neutrófilos tienen un papel esencial. El modelo de bolsa de aire permite la determinación de los efectos de los péptidos en un curso breve de la inflamación (aproximadamente 4 horas) y el modelo de peritonitis es útil con respecto a un curso más prolongado de la inflamación (aproximadamente 24 horas).

Diseño experimental general:

15 Cuatro estudios, dos para cada modelo, uno que prueba la administración i.v. de los péptidos y uno que prueba la administración local de los péptidos, son útiles para estudiar el efecto de los péptidos descritos en esta solicitud. Cada estudio consta de 2 grupos experimentales, un control no inflamado (tratado con vehículo) y un grupo inflamado (es decir, tratado con un estímulo inflamatorio). Cada grupo se divide en 5 y opcionalmente 6 subgrupos de tratamiento, n = 6 para cada subgrupo. Los subgrupos de tratamientos son, por ejemplo: vehículo, MANS, RNS, péptido de prueba, opcionalmente un péptido que tiene una secuencia mezclada del péptido de prueba, cuya secuencia codificada se denomina "péptido-SCR" y dexametasona. La dexametasona sirve como un agente antiinflamatorio de referencia. La selección de dosis apropiadas para la inyección i.v. o la instilación local se determinan a partir de experimentos preliminares de respuesta a la dosis. Las dosis tentativas basadas en la actividad inhibitoria de MANS en neutrófilos humanos son: 1 mg/kg para administración i.v. se suministró una vez o se administró una concentración final de 50  $\mu$ M localmente (en la bolsa de aire o i.p.). La dosis para administración i.v. se eligen asumiendo un volumen de distribución de 2 l/kg.

20 Modelo de inflamación de la bolsa de aire: Los ensayos para la infiltración de neutrófilos y la inflamación en la bolsa de aire del ratón se realizan como se describe en Clish CB, O'Brien JA, Gronert K, Stahl GL, Petasis NA, Serhan CN. Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1999 6 de julio; 96(14): 8247-52. De este modo, se anestesian ratones BALB/c macho blancos (6-8 semanas) con isoflurano, y se levantan bolsas de aire dorsal inyectando 3 ml de aire estéril por vía subcutánea los días 0 y 3. En el día 6 y mientras los ratones se anestesian con isoflurano, se administran vehículo, MANS, RNS, péptido de prueba, u opcionalmente péptido-SCR como una inyección de bolo i.v. en la vena de la cola en 100  $\mu$ L de solución salina al 0.9% estéril o localmente en la bolsa de aire en 900  $\mu$ L de PBS -/- (Solución salina regulada con fosfato de Dulbecco sin iones de magnesio o calcio, BioWhittaker). Se administra dexametasona (Sigma) i.v. como 0.1 mg/kg en 100  $\mu$ l de solución salina al 0.9% estéril o localmente como 10  $\mu$ g en 900  $\mu$ l de PBS -/-, sirve como agente antiinflamatorio de referencia. La inflamación en la bolsa de aire se induce mediante una inyección local de factor de necrosis tumoral murino recombinante  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 20 ng) (Boehringer Mannheim) disuelto en 100  $\mu$ l de PBS estéril. Mientras los ratones se anestesian con isoflurano, las bolsas de aire se lavan dos veces con 3 ml de PBS estéril 4 h después de la inyección inicial de TNF- $\alpha$ . Los aspirados se centrifugan a 2000 rpm durante 15 min a 23°C. Los sobrenadantes se eliminan y las células se suspenden en 500  $\mu$ L de PBS. Se analizan las alícuotas del sobrenadante para determinar las concentraciones de mediadores inflamatorios (opcionalmente, excepto el TNF $\alpha$ ), la actividad de la MPO y la peroxidación lipídica.

35 Los leucocitos totales se enumeran en la suspensión celular mediante microscopía óptica utilizando un hemocitómetro. Las células de aspirado resuspendidas (50  $\mu$ L) se agregan a 150  $\mu$ L de BSA al 30% y se centrifugan en portaobjetos de microscopio a 2.200 rpm durante 4 minutos utilizando una citofuga. Los recuentos de leucocitos diferenciales se determinan en citorrotación teñidos con tinción de Wright Giemsa y se utilizan para calcular el número absoluto de cada leucocito por exudado de bolsa de aire. Para el análisis microscópico, los tejidos se obtienen con un punzón de biopsia de tejido de 6 mm (Acu-Punch, Acuderm) y se fijan en formaldehído regulado al 10%. Luego, las muestras se embeben en parafina, se cortan y se tiñen con hematoxilina-eosina. Los neutrófilos se enumeran en secciones histológicas contando el número de células/hpf. La dermis distante sirve como control para la dermis inflamada de la bolsa de aire.

40 Los datos se presentan como el número total de neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos por exudado o el número de neutrófilos por campo de alta magnificación del tejido. Los valores se informan como la media  $\pm$  SEM (n=6). La importancia de cualquier tratamiento en la migración es determinada por ANOVA.  $P < 0.05$  debe ser considerado significativo.

Ejemplo 6.

55 Modelo de peritoneo inflamado:

Se usan ratones BALB/c macho (6-8 semanas) y los modelos de peritonitis inducida por tioglicolato se realizan como se describe en Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into

inflammatory sites. J Exp Med. 1995 1 de junio; 181(6): 2259-64. Se administran vehículo, MANS, RNS, péptido de prueba y, opcionalmente, péptido-SCR como inyección en bolo en la vena de la cola en 100 µL de solución salina al 0.9% estéril o localmente en el peritoneo 900 µL de PBS +/- inmediatamente antes de la inyección i.p. de tioglicolato. Se administra dexametasona i.v. como 0.1 mg/kg en 100 µL de solución salina al 0.9% o localmente como 10 µg en 900 µL de PBS +/-, y sirve como agente antiinflamatorio de referencia. La inflamación se induce mediante la inyección de 1 ml de solución de tioglicolato (3% peso/volumen; Sigma Immunochemicals) por vía intraperitoneal en los ratones. Los ratones se sacrificaron con humanidad 24 horas después de la inducción de la inflamación y 5 ml de medio tibio (37°C ~ medio (RPMI 1640, 2% FCS y 2 mM EDTA) inyectados en el peritoneo seguido de un suave masaje del abdomen. Aspirados del fluido de lavado abdominal se centrifugan a 2000 rpm durante 15 minutos a 23°C. Se eliminan los sobrenadantes y se suspenden las células en 500 µL de PBS. Se analizan las alícuotas del sobrenadante para determinar la actividad de la MPO, las concentraciones de mediadores inflamatorios y la peroxidación lipídica.

Los leucocitos totales se enumeran en la suspensión celular mediante microscopía óptica utilizando un hemocitómetro. Las células de aspirado resuspendidas (50 µL) se agregan a 150 µL de BSA al 30% y se centrifugan en portaobjetos de microscopio a 2200 rpm durante 4 minutos utilizando una citofuga. Los recuentos de leucocitos diferenciales se determinan en citorrotación teñidos con tinción de Wright Giemsa y se utilizan para calcular el número absoluto de cada leucocito por aspirado de bolsa de aire.

Los datos se presentan como el número total de neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos por exudado. Los valores se informan como la media ± SEM (n=6). La importancia de cualquier tratamiento en la migración está determinada por ANOVA. P<0.05 debe ser considerado significativo.

Desgranulación:

La mieloperoxidasa se usa como un marcador de desgranulación. La actividad de la mieloperoxidasa en el sobrenadante celular obtenido de la bolsa de aire o del fluido de lavado peritoneal se prueba y analiza como se describió anteriormente utilizando el método TMB.

Concentraciones mediadoras inflamatorias:

Las concentraciones de los mediadores proinflamatorios clave TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, KC y PGE2 en la bolsa de aire y el fluido de lavado peritoneal se determinan utilizando kits ELISA comerciales (R&D Systems) de acuerdo con los fabricantes instrucciones.

Peroxidación lipídica:

La concentración de isoprostanos F2 es una medida sensible y específica de la lesión oxidativa resultante de la liberación de intermediarios de oxígeno reactivos de los neutrófilos y otras células {Milne GL, Musiek ES, Morrow JD. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. Biomarkers. 2005 Nov; 10 Suppl 1S10-23}. La concentración de isoprostano F2 se determina en la bolsa de aire y los sobrenadantes de exudado peritoneal utilizando un ELISA disponible comercialmente (8-Isoprostano EIA, Cayman Chemical) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Punto final:

Se considera que el experimento es exitoso si la administración local o sistémica del péptido de prueba reduce la inflamación por una o más de las medidas anteriores de inhibición de la liberación del mediador inflamatorio.

Los péptidos de fragmentos activos para uso de acuerdo con esta invención inhiben la afluencia de neutrófilos y la desgranulación en la bolsa de aire inflamado o peritoneo, dando como resultado una actividad reducida de la MPO, una menor peroxidación lipídica y una producción reducida de mediadores inflamatorios.

Los ejemplos anteriores son ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de la misma. La invención se define por las siguientes reivindicaciones, con equivalentes de las reivindicaciones para ser incluidos en las mismas.

LISTADO DE SECUENCIAS<110> BioMarck Pharmaceuticals, Ltd.

<120>Métodos para atenuar la liberación de mediadores inflamatorios y péptidos útiles en los mismos

<130> BMRK-004/01WO

<150> US 60/833,239

<151> 2006-07-26

<160> 252

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N <400> 1

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**  
**1 5 10 15**

**Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**  
**20**

<210> 2

10 <211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 2

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**  
**1 5 10 15**

**Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**  
**20**

<210> 3

20 <211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 3

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg  
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala  
 20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

10 <400> 4

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu  
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala  
 20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220><223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 5

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg  
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala Ala Val  
 20

20

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 6

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro  
1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala Val Ala  
20

<210> 7

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

10 <400> 7

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu  
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala  
20

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 8

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg  
1 5 10 15

20 Pro Gly Glu Ala Ala  
20

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

ES 2 725 599 T3

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 9

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**  
**1 5 10 15**

**Gly Glu Ala Ala Val**  
**20**

<210> 10

5 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

10 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 10

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**  
**1 5 10 15**

**Glu Ala Ala Val Ala**  
**20**

<210> 11

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

20 <400> 11

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**  
**1 5 10 15**  
**Arg Pro Gly Glu**  
**20**

<210> 12

<211> 20

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 12

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg  
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Ala  
 20

<210> 13

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

10 <400> 13

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro  
 1 5 10 15

Gly Glu Ala Ala  
 20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220><223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 14

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Val  
 20

20 <210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>





**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**  
 1 5 10 15

**Ala Val Ala**

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 22

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**  
 1 5 10 15

10 **Arg Pro**

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 23

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**  
 1 5 10 15

**Pro Gly**

20 <210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 24



**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**  
 1 5 10 15

**Ala Val**

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 28

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**  
 1 5 10 15

10 **Val Ala**

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 29

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**  
 1 5 10 15

**Arg**

20 <210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 30

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**  
 1 5 10 15

**Pro**

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 31

10 **Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**  
 1 5 10 15

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 32

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**  
 1 5 10 15

**Glu**

20 <210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 33

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**  
 1 5 10 15

**Ala**

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 34

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**  
**1 5 10 15**

**Ala**

10 <210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 35

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**  
**1 5 10 15**

**Val**

<210> 36

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

25 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 36

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**  
**1 5 10 15**

**Ala**

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

5 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 37

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**  
**1 5 10 15**

<210> 38

<211> 16

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223>El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

15 <400> 38

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**  
**1 5 10 15**

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**  
**<400> 39 1 5 10 15**

25 <210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223>El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**  
**<400> 40 1 5 10 15**

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

5 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**  
 <400> 41 **1** **5** **10** **15**  
 <210> 42

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**  
 <400> 42 **1** **5** **10** **15**  
 <210> 43

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**  
 <400> 43 **1** **5** **10** **15**  
 <210> 44

25 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**  
 <400> 44 **1** **5** **10** **15**  
 <210> 45

30 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 45

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**  
**1 5 10 15 <210> 46**

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

10 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala**  
 <400> 46 **1 5 10 15 <210>**  
 47

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 47

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**  
 20 **1 5 10 15 <210> 48**

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**  
 <400> 48 **1 5 10 15 <210>**  
 49

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**  
 <400> 49 **1** 5 10 15 <210>  
 50  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**  
 <400> 50 **1** 5 10 15 <210>  
 10 51  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**  
 <400> 51 **1** 5 10 15 <210>  
 52  
 <211> 15  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**  
 <400> 52 **1** 5 10 15 <210>  
 25 53  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**  
 <400> 53 **1** 5 10 15 <210>  
 54



<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**

<400> 58 **1** **5** **10** <210> 59

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

10 <400> 59 **1** **5** **10** <210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 60 **1** **5** **10** <210> 61

<211> 14

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

<400> 61 **1** **5** **10** <210> 62

25 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 62 **1** **5** **10** <210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

5 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

<400> 63 **1** **5** **10** <210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 64 **1** **5** **10** <210> 65

<211> 14

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**

20 <400> 65 **1** **5** **10** <210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**

<400> 66 **1** **5** **10** <210> 67

<211> 13

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala**  
 <400> 67 1 5 10  
 <210> 68  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N  
 10 <400> 68  
**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala**  
 1 5 10  
 <210> 69  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N  
 20 <400> 69  
**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala**  
 1 5 10  
 <210> 70  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N  
 30 <400> 70  
**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**  
 1 5 10  
 <210> 71  
 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

<400> 71 **1** **5** **10**

<210> 72

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 72 **1** **5** **10**

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

25 <400> 73 **1** **5** **10**

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 74 **1** **5** **10**

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

10 <400> 75 **1** **5** **10**

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 76 **1** **5** **10**

20 <210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**

<400> 77 **1** **5** **10**

<210> 78

30 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>



<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala**

<400> 82 **1** **5** **10**

<210> 83

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**

<400> 83 **1** **5** **10**

<210> 84

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

<400> 84 **1** **5** **10**

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 85 **1** **5** **10**

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

10 <400> 86 **1** **5** **10**

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 87 **1** **5** **10**

20 <210> 88

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

<400> 88 **1** **5** **10**

<210> 89

30 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 89 **1** **5** **10**

5 <210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**

<400> 90 **1** **5** **10**

<210> 91

15 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**

<400> 91 **1** **5** **10**

<210> 92

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly**

<400> 92 **1** **5** **10**

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu**

<400> 93 **1** **5** **10**

<210> 94

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala**

<400> 94 **1** **5** **10**

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala**

25 <400> 95 **1** **5** **10**

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala**

<400> 96 **1** **5** **10**

<210> 97

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**

10 <400> 97 **1** **5** **10**

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

<400> 98 **1** **5** **10**

20 <210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 99 **1** **5** **10**

<210> 100

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

<400> 100 **1** **5** **10**

5 <210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 101 **1** **5** **10**

<210> 102

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

<400> 102 **1** **5** **10**

<210> 103

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 103 **1** **5** **10**

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**

<400> 104 **1** **5** **10**

<210> 105

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**

<400> 105 **1** **5** **10**

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys**

25 <400> 106 **1** **5** **10**

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly**

<400> 107 **1** **5** **10**

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu**

10 <400> 108 **1** **5** **10**

<210> 109

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala**

<400> 109 **1** **5** **10**

20 <210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala**

<400> 110 **1** **5** **10**

<210> 111

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala**

<400> 111 **1** **5** **10**

5 <210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**

<400> 112 **1** **5** **10**

<210> 113

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 113

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

**1** **5** **10**

<210> 114

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 114 **1** **5** **10**

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

<400> 115 **1** **5** **10**

<210> 116

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 116 **1** **5** **10**

<210> 117

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

<400> 117 **1** **5** **10**

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 118 **1** **5** **10**

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**

10 <400> 119 **1** **5** **10**

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**

<400> 120 **1** **5** **10**

20 <210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala**

<400> 121 **1** **5**

<210> 122

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223>El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys**

<400> 122 **1** **5**

5 <210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly**

<400> 123 **1** **5**

<210> 124

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu**

<400> 124 **1** **5**

<210> 125

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala**

<400> 125 **1** **5**

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala**

<400> 126 **1**

**5**

<210> 127

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala**

<400> 127 **1**

**5**

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**

25 <400> 128 **1**

**5**

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

<400> 129 **1**

**5**

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

10 <400> 130 **1**

**5**

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

<400> 131 **1**

**5**

20 <210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 132 **1**

**5**

<210> 133

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

<400> 133 **1** **5**

5 <210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 134 **1** **5**

<210> 135

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**

<400> 135 **1** **5**

<210> 136

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**

<400> 136 **1** **5**

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala**

<400> 137 **1** **5**

<210> 138

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala**

<400> 138 **1** **5**

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys**

25 <400> 139 **1** **5**

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly**

<400> 140 **1** **5**

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu**

10 <400> 141 **1** **5**

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala**

<400> 142 **1** **5**

20 <210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala**

<400> 143 **1** **5**

<210> 144

30 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala**

<400> 144 **1**

**5**

5 <210> 145

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**

<400> 145 **1**

**5**

<210> 146

15 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

<400> 146 **1**

**5**

<210> 147

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 147 **1**

**5**

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

<400> 148 **1** **5**

<210> 149

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 149 **1** **5**

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

25 <400> 150 **1** **5**

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 151 **1** **5**

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**

10 <400> 152 **1** **5**

<210> 153

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**

<400> 153 **1** **5**

20 <210> 154

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr**

<400> 154 **1** **5**

<210> 155

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala**

<400> 155 **1** **5**

5 <210> 156

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala**

<400> 156 **1** **5**

<210> 157

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys**

<400> 157 **1** **5**

<210> 158

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly**

<400> 158 **1** **5**

<210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu**

<400> 159 **1**

**5**

<210> 160

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala**

<400> 160 **1**

**5**

<210> 161

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala**

25 <400> 161 **1**

**5**

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala**

<400> 162 **1** **5**

<210> 163

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu**

10 <400> 163 **1** **5**

<210> 164

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

<400> 164 **1** **5**

20 <210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 165 **1** **5**

<210> 166

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

<400> 166 **1** **5**

5 <210> 167

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 167 **1** **5**

<210> 168

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

<400> 168 **1** **5**

<210> 169

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 169 **1** **5**

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val**

<400> 170 **1** **5**

<210> 171

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala**

<400> 171 **1** **5**

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys**

25 <400> 172 **1** **5**

<210> 173

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Gln Phe Ser Lys Thr**

<400> 173 **1** **5**

<210> 174

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr Ala**

10 <400> 174 **1** **5**

<210> 175

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala Ala**

<400> 175 **1** **5**

20 <210> 176

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala Lys**

<400> 176 **1** **5**

<210> 177

30 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<220>  
<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 177

5 <210> 178  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<220>  
<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 178  
<210> 179

15 <211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>  
<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 179  
<210> 180  
<211> 6

25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala Ala**

<400> 180 **1** **5**

<210> 181

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala Ala**

<400> 181 **1** **5**

<210> 182

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala Glu**

<400> 182 **1** **5**

<210> 183

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Ala Ala Ala Glu Arg**

25 <400> 183 **1** **5**

<210> 184

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 184 **1** **5**

<210> 185

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Glu Arg Pro Gly**

10 <400> 185 **1** **5**

<210> 186

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Glu Arg Pro Gly Glu**

<400> 186 **1** **5**

20 <210> 187

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Arg Pro Gly Glu Ala**

<400> 187 **1** **5**

<210> 188

30 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Arg Pro Gly Glu Ala Ala**

<400> 188 **1** **5**

5 <210> 189

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Pro Gly Glu Ala Ala Val**

<400> 189 **1** **5**

<210> 190

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Val Ala**

<400> 190 **1** **5**

<210> 191

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser**

<400> 191 **1** **5**

<210> 192

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Gln Phe Ser Lys**

<400> 192 **1**

**5**

<210> 193

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223>El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gln Phe Ser Lys Thr**

<400> 193 **1**

**5**

<210> 194

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Phe Ser Lys Thr Ala**

25 <400> 194 **1**

**5**

<210> 195

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ser Lys Thr Ala Ala**

<400> 195 **1** **5**

<210> 196

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Thr Ala Ala Lys**

10 <400> 196 **1** **5**

<210> 197

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Thr Ala Ala Lys Gly**

<400> 197 **1** **5**

20 <210> 198

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Lys Gly Glu**

<400> 198 **1** **5**

<210> 199

30 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Lys Gly Glu Ala**

<400> 199 **1** **5**

5 <210> 200

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Lys Gly Glu Ala Ala**

<400> 200 **1** **5**

<210> 201

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Glu Ala Ala Ala**

<400> 201 **1** **5**

<210> 202

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Glu Ala Ala Ala Glu**

<400> 202 **1** **5**

<210> 203

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Ala Glu Arg**

<400> 203 **1** **5**

<210> 204

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223>El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Ala Glu Arg Pro**

<400> 204 **1** **5**

<210> 205

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Glu Arg Pro Gly**

25 <400> 205 **1** **5** 210> 206

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 206

**Glu Arg Pro Gly Glu**  
**1 5**

<210> 207

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

10 <400> 207

**Arg Pro Gly Glu Ala**  
**1 5**

<210> 208

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

20 <400> 208

**Pro Gly Glu Ala Ala**  
**1 5**

<210> 209

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

30 <400> 209

**Gly Glu Ala Ala Val**  
**1 5**

<210> 210

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 210

**Glu Ala Ala Val Ala**  
**1 5**

<210> 211

10 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 211

**Gly Ala Gln Phe**  
**1**

<210> 212

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Ala Gln Phe Ser**

<400> 212 **1**

<210> 213

<211> 4

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 213

**Gln Phe Ser Lys**

**1**

<210> 214

5 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 214

**Phe Ser Lys Thr**

**1**

<210> 215

15 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 215

**Ser Lys Thr Ala**

**1**

<210> 216

25 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 216

**Lys Thr Ala Ala**

**1**

<210> 217

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 217

**Thr Ala Ala Lys**

10 **1**

<210> 218

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 218

**Ala Ala Lys Gly**

20 **1**

<210> 219

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 219

**Ala Lys Gly Glu**

30 **1**

<210> 220

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

5 <400> 220

**Lys Gly Glu Ala**

**1**

<210> 221

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

15 <400> 221

**Gly Glu Ala Ala**

**1**

<210> 222

<211> 4

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

25 <400> 222

**Glu Ala Ala Ala**

**1**

<210> 223

<211> 4

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 223

**Ala Ala Ala Glu**

**1**

<210> 224

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

10 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 224

**Ala Ala Glu Arg**

**1**

<210> 225

<211> 4

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

20 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 225

<210> 226

<211> 4

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

30 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 226

<210> 227

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 227

<210> 228

10 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 228

**Pro Gly Glu Ala**

**1**

<210> 229

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 229

**Gly Glu Ala Ala**

**1**

<210> 230

30 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético



**Gly Lys Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu**  
**1 5 10**

<210> 234

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

10 <400> 234

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Lys Ala Lys Gly Glu**  
**1 5 10**

<210> 235

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

20 <400> 235

**Gly Lys Gln Phe Ser Lys Thr Lys Ala Lys Gly Glu**  
**1 5 10**

<210> 236

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

30 <400> 236

**Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala Ala Lys**  
**1 5 10**

<210> 237

<211> 12

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N  
 <400> 237

**Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu**  
**1 5 10**

<210> 238

10 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N  
 <400> 238

**Gly Ala Glu Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu**  
**1 5 10**

<210> 239

20 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <220>  
 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Ala Gly Glu**  
 <400> 239 **1 5 10**

<210> 240  
 <211> 12

30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético  
 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 240

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Ala Glu**  
**1 5 10**

<210> 241

5 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 241

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Ala**  
**1 5 10**

<210> 242

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 242

**Ala Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys**  
**1 5 10**

<210> 243

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30 <220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 243

**Gly Ala Ala Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys**  
**1 5 10**

<210> 244

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 244

**Gly Ala Gln Phe Ala Lys Thr Ala Ala Lys**

10 **1 5 10**

<210> 245

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 245

**Gly Ala Gln Phe Ser Ala Thr Ala Ala Lys**

20 **1 5 10**

<210> 246

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 246

**Lys Ala Ala Thr Lys Ser Phe Gln Ala Gly**

30 **1 5 10**

<210> 247

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

5 <400> 247

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Ala Ala Ala Lys**  
**1 5 10**

<210> 248

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

15 <400> 248

**Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Ala**  
**1 5 10**

<210> 249

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

25 <400> 249

**Gly Ala Gln Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ala**  
**1 5 10**

<210> 250

<211> 8

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 250

**Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala**  
**1 5**

<210> 251

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

10 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 251

**Ala Ala Gly Glu**  
**1**

<210> 252

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>

20 <223> El péptido puede o no ser modificado en un terminal C y/o un terminal N

<400> 252

**Gly Lys Ala Ser Gln Phe Ala Lys Thr Ala**  
**1 5 10**

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido para uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas que involucran inflamación, en donde dicho péptido es un péptido acetilado N-terminal que tiene de 4 a 23 aminoácidos contiguos de una secuencia de referencia, la SEQ ID NO: 1, o una secuencia que tiene al menos 75% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y en donde la enfermedad es el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), o fase aguda de lesión térmica.
- 10 2. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido se selecciona del grupo que consiste en: acetil-GAQFSKTAAK (SEQ ID NO: 106), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 1), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGE (SEQ ID NO: 11), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAE (SEQ ID NO: 37), acetil-AKGEAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 45), acetil-GAQFSKTAAKGE (SEQ ID NO: 79), acetil-AAAERPGEAAVA (SEQ ID NO: 91), acetil-GAQFSKTAA (SEQ ID NO: 121), acetil-TAAKGEAA (SEQ ID NO: 143), acetil-RPGEAAVA (SEQ ID NO: 153), acetil-AKGE (SEQ ID NO: 219), acetil-GAQFSKTAAGE (SEQ ID NO: 239), acetil-GAQFSKTAATAA (SEQ ID NO: 248), acetil-GAQFSKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 79), acetil-AQFSKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 93), acetil-QFSKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 108), acetil-FSKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 124), acetil-SKTAAKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 141), y acetil-AKGE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 219).
- 15 3. El péptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el péptido está en una cantidad terapéuticamente efectiva reductora de la liberación del mediador inflamatorio y reduce la cantidad de al menos un mediador inflamatorio liberado de al menos una célula inflamatoria en comparación con la liberación de dicho mediador inflamatorio de al menos una del mismo tipo de célula inflamatoria que se produciría en ausencia de dicho péptido.
- 20 4. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha célula inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en un leucocito, un granulocito, un neutrófilo, un basófilo, un eosinófilo, un monocito, un macrófago y una combinación de los mismos.
- 25 5. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho al menos un mediador inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), eosinófilo peroxidasa (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima, histamina, proteoglicano, proteasa, un factor quimiotáctico, citoquina, un metabolito del ácido araquidónico, defensina, proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, fosfolipasa A<sub>2</sub>, condroitina-4-sulfato, proteinasa 3, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, receptor del complemento, N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP), receptor de laminina, citocromo b<sub>558</sub>, factor monocito-quimiotáctico, histaminasa, proteína de unión a la vitamina B12, gelatinasa, activador del plasminógeno, beta-D-glucuronidasa, y una combinación de los mismos.
- 30 6. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde al menos un mediador inflamatorio es la eosinófilo peroxidasa (EPO).
7. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde al menos un mediador inflamatorio es mieloperoxidasa (MPO).
- 35 8. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde al menos un mediador inflamatorio es la lisozima.
9. El péptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el péptido se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cantidad efectiva reductora de la liberación del mediador inflamatorio de dicho péptido comprende una cantidad de péptido que inhibe la desgranulación que reduce la cantidad de al menos un mediador inflamatorio liberado de al menos una célula inflamatoria de entre 5 a 99% en comparación con la cantidad liberada de al menos una célula inflamatoria en ausencia del péptido.
- 45 11. El péptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el péptido se administra por administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, administración nasal o administración oral.
12. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la administración pulmonar comprende un aerosol.
13. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el aerosol se genera a partir de un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida o un nebulizador.
- 50 14. El péptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, con una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un compuesto antiviral, un compuesto antiparasitario, un compuesto antiinflamatorio y un inmunomodulador.

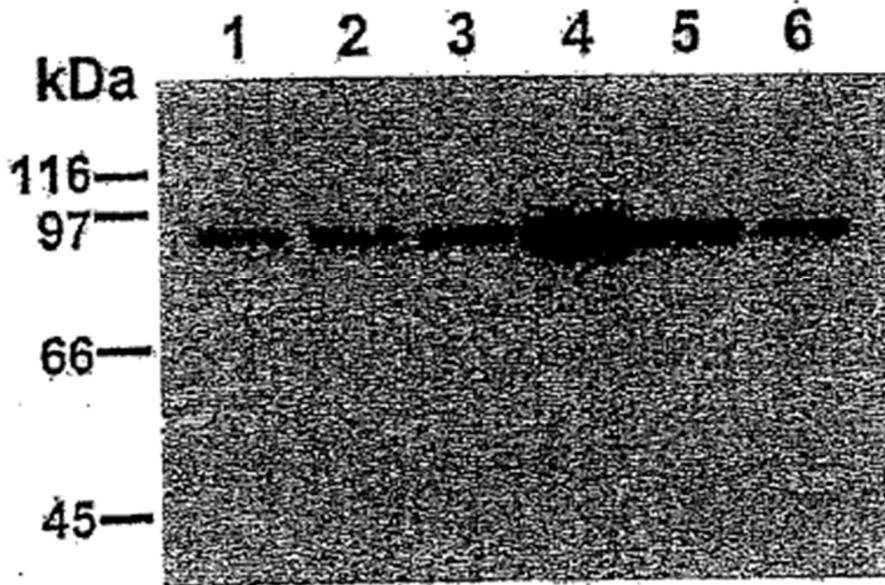


FIG. 1A

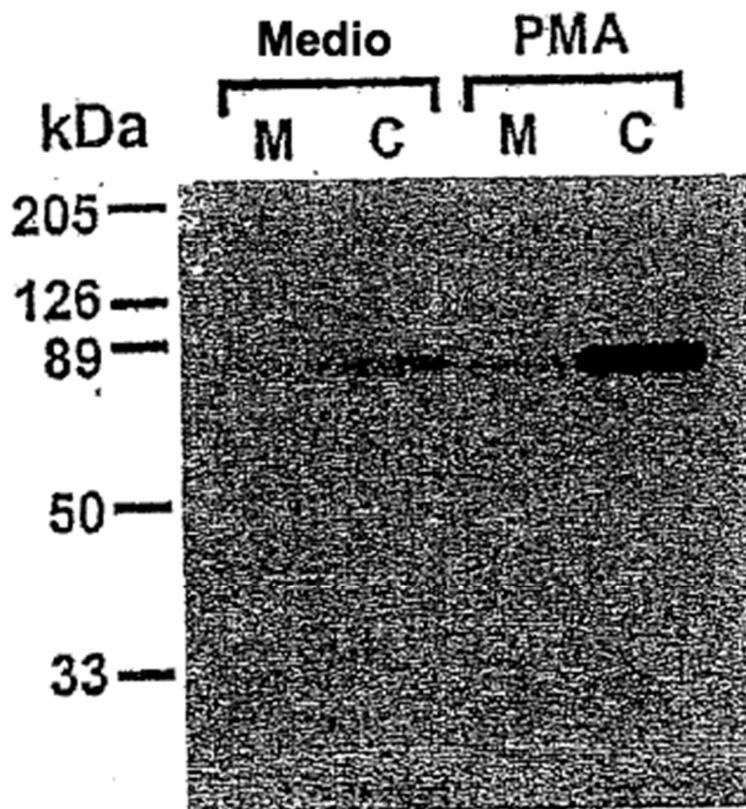


FIG. 1B

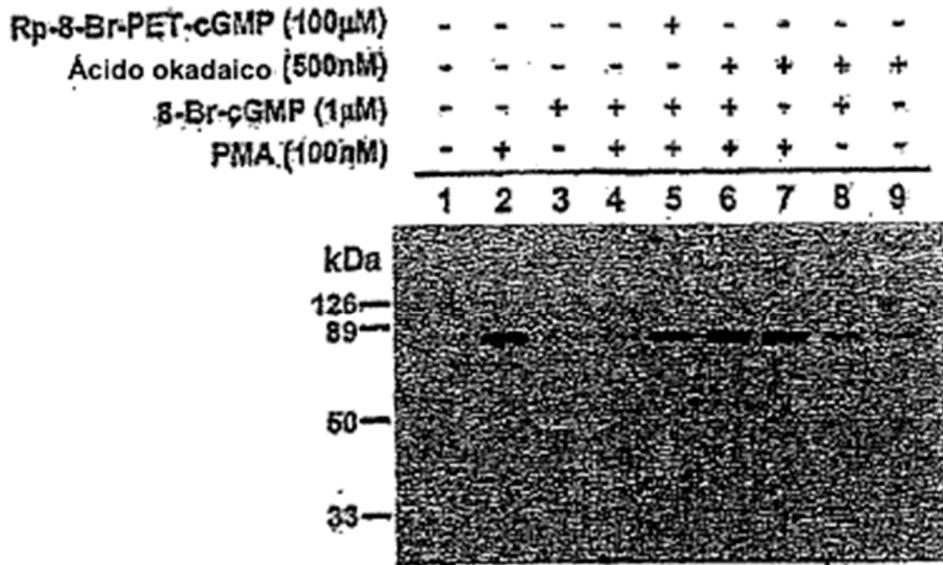


FIG. 2A

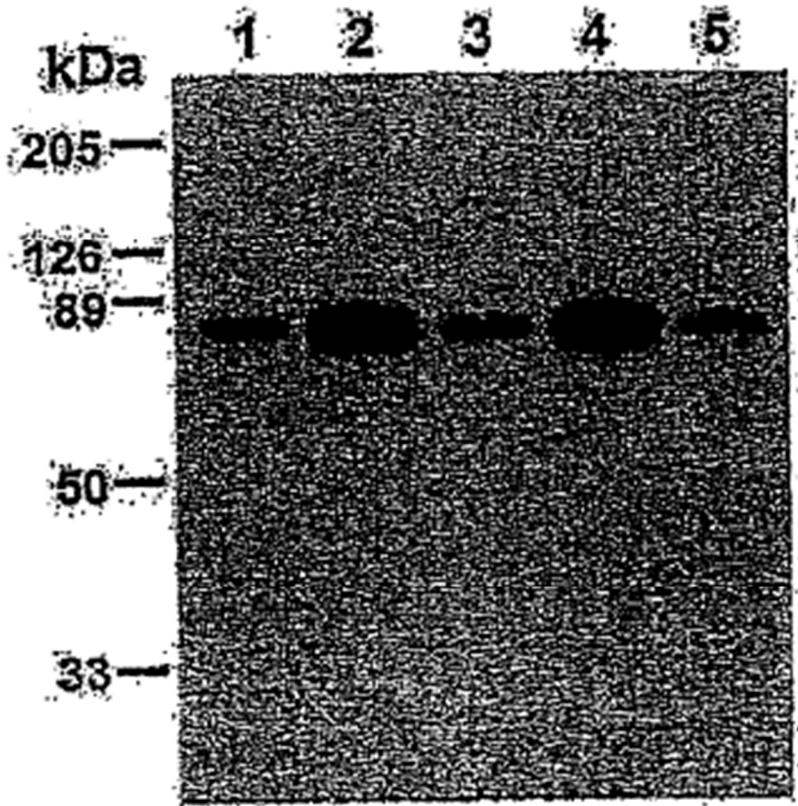


FIG. 2B

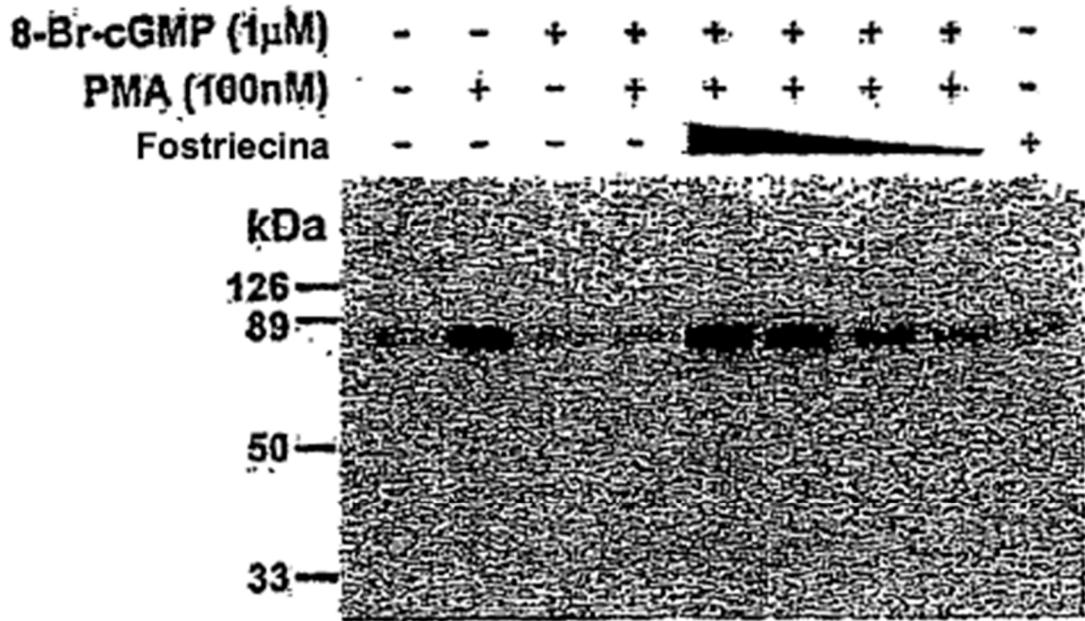


FIG. 2C

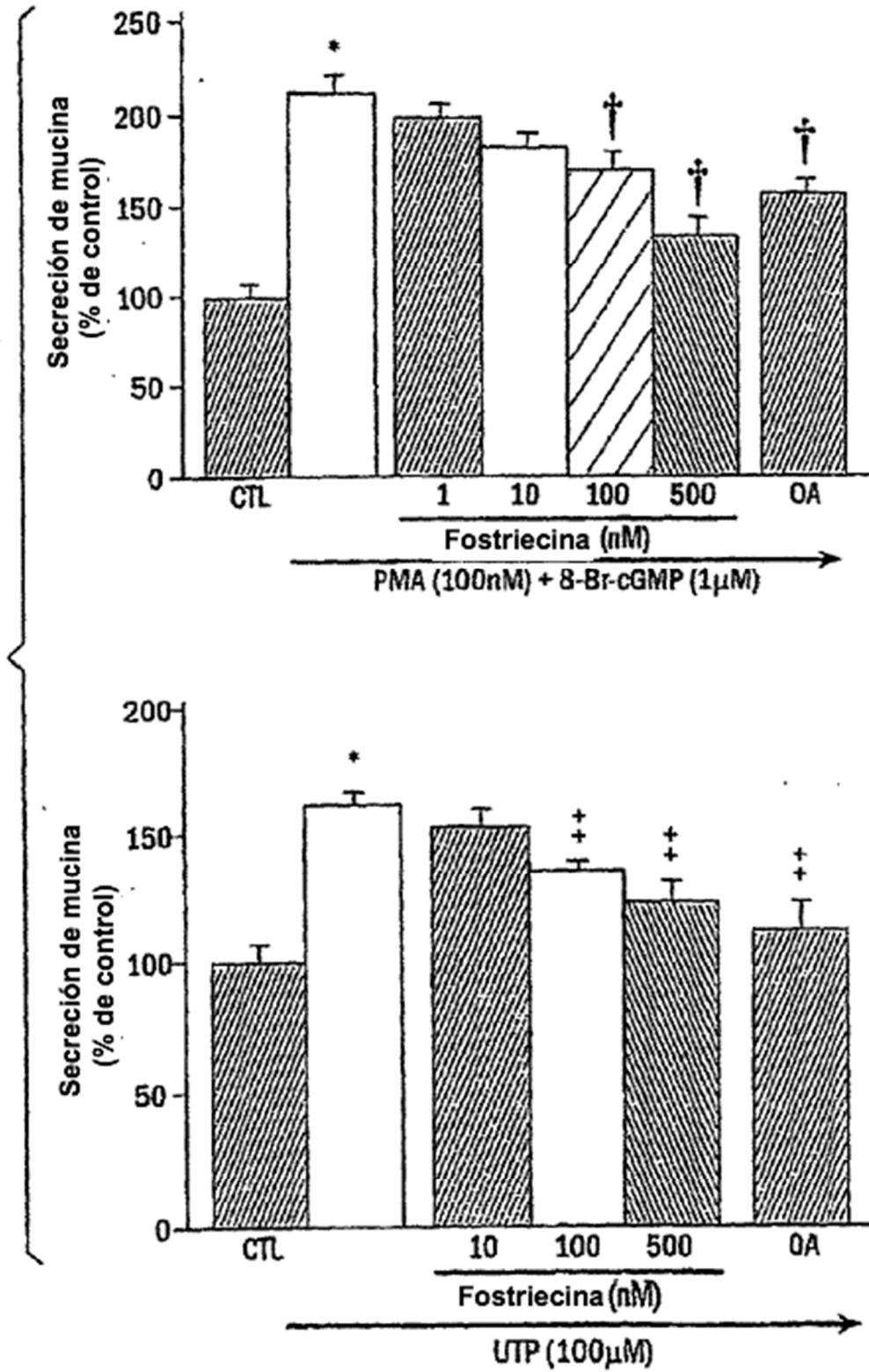


FIG. 3

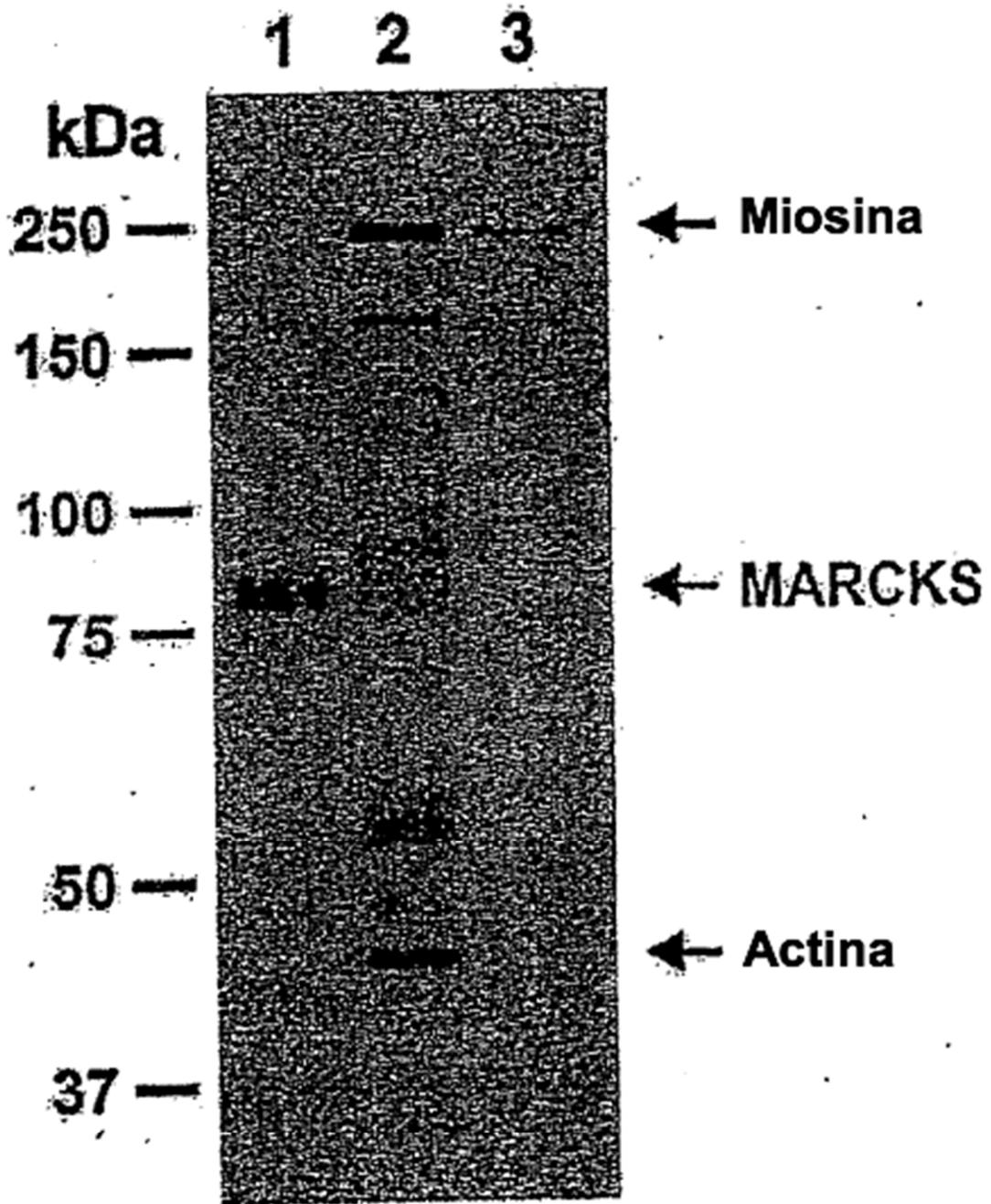


FIG. 4

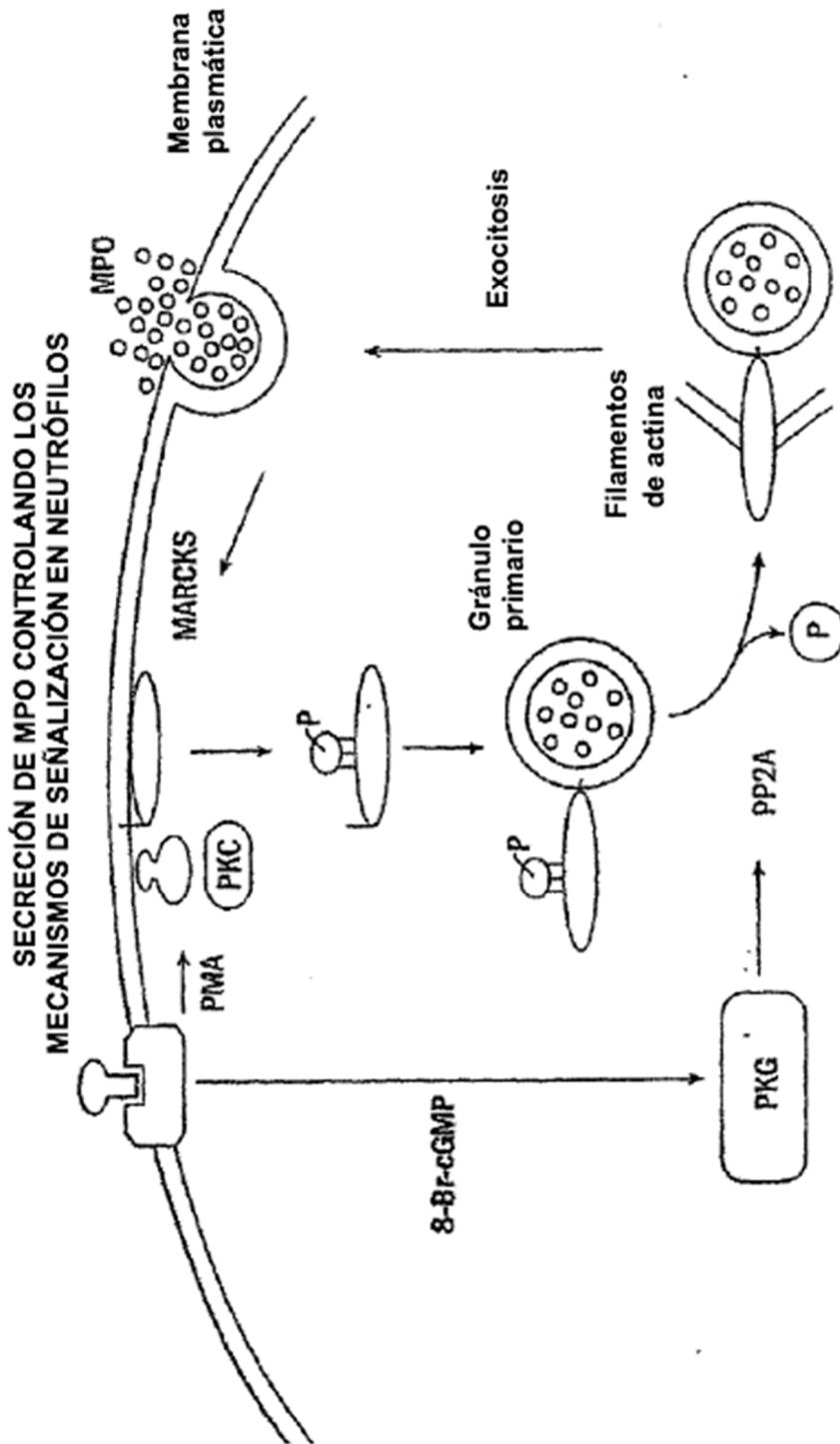
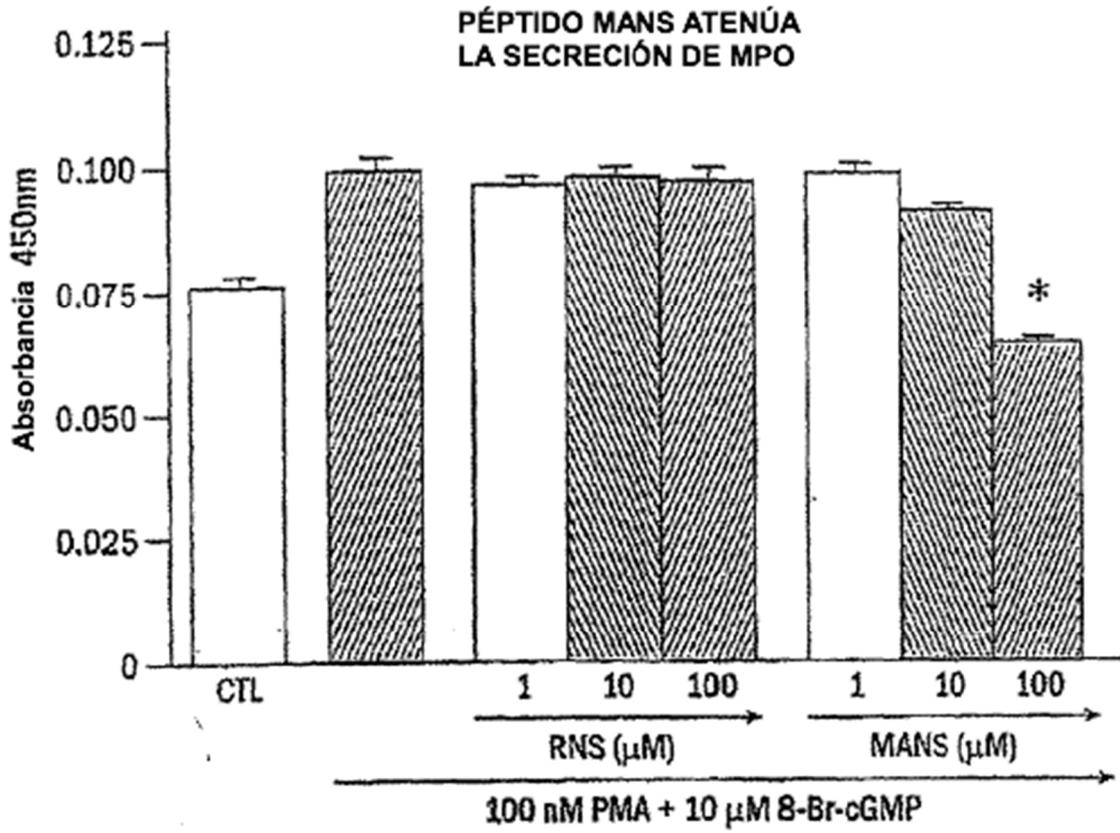
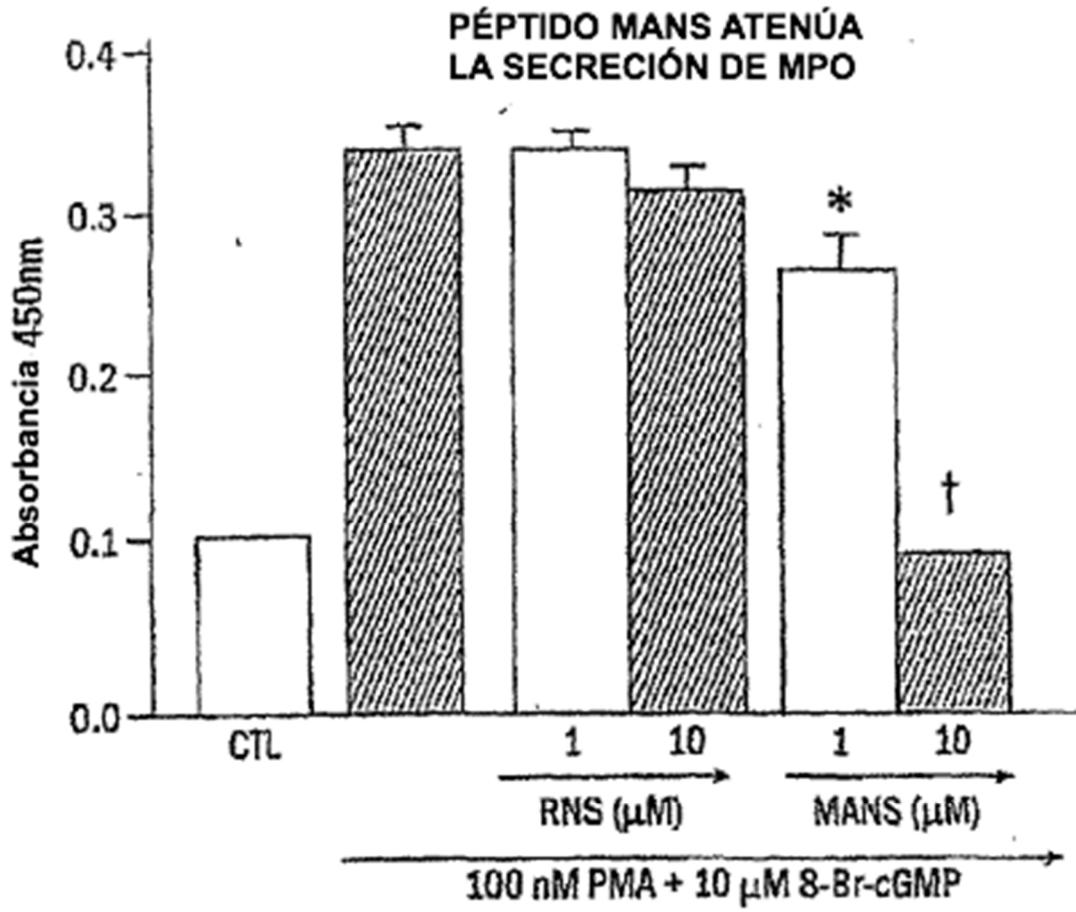


FIG. 5



**FIG. 6**



**FIG. 7**

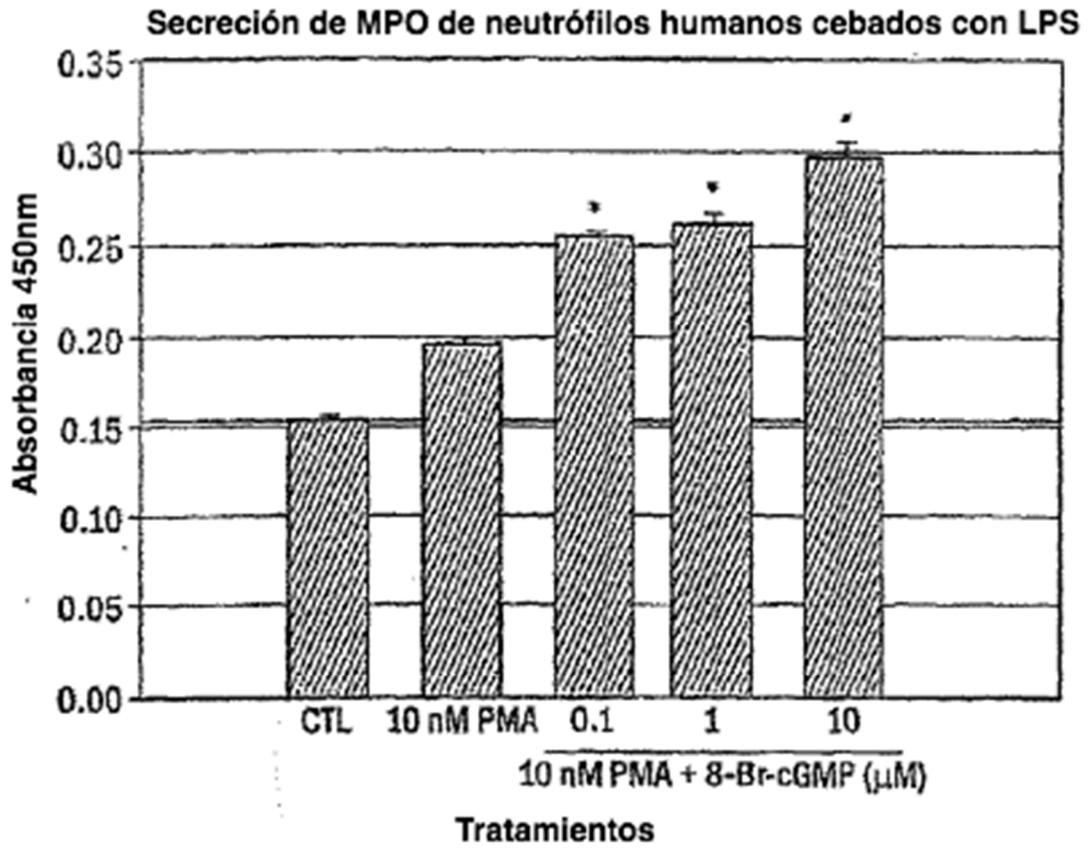


FIG. 8

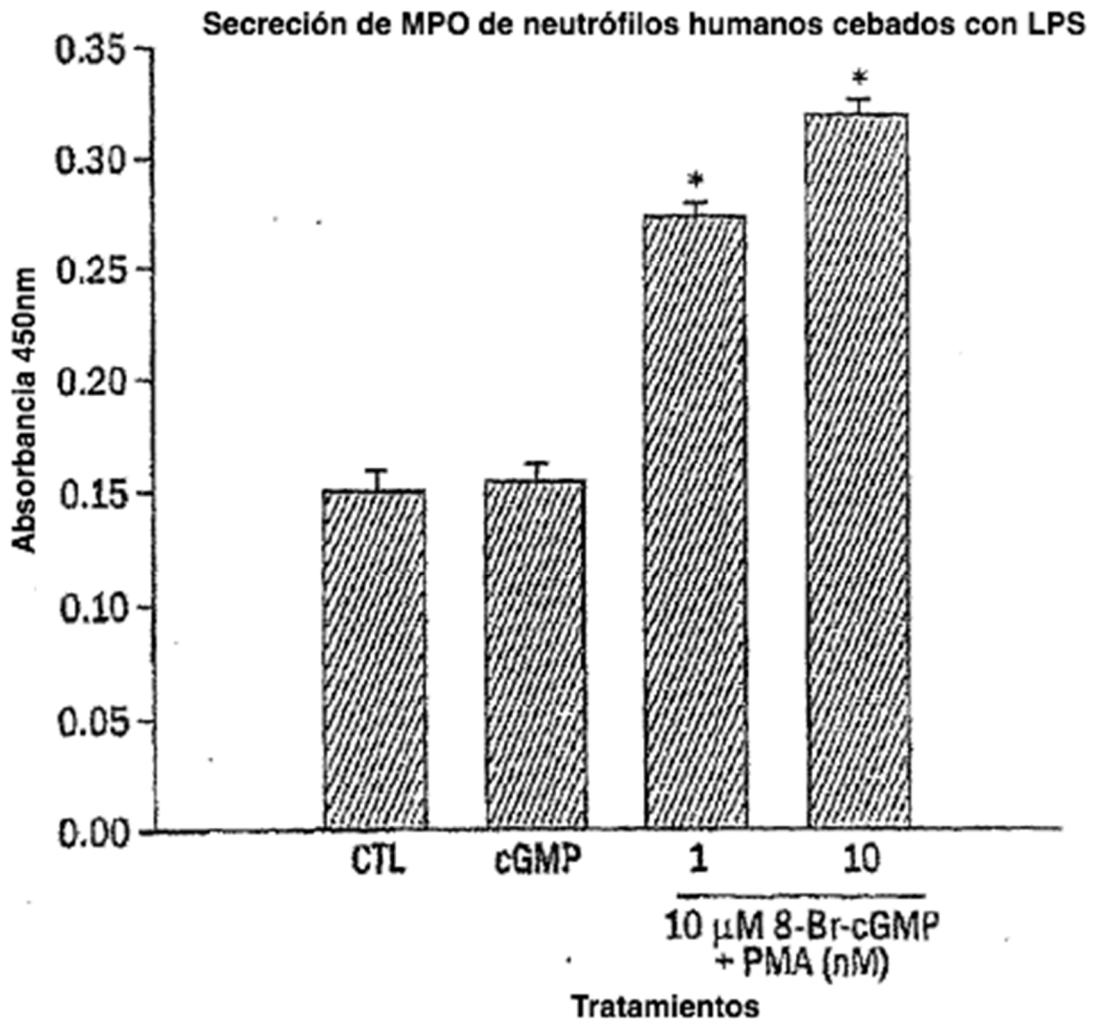


FIG. 9

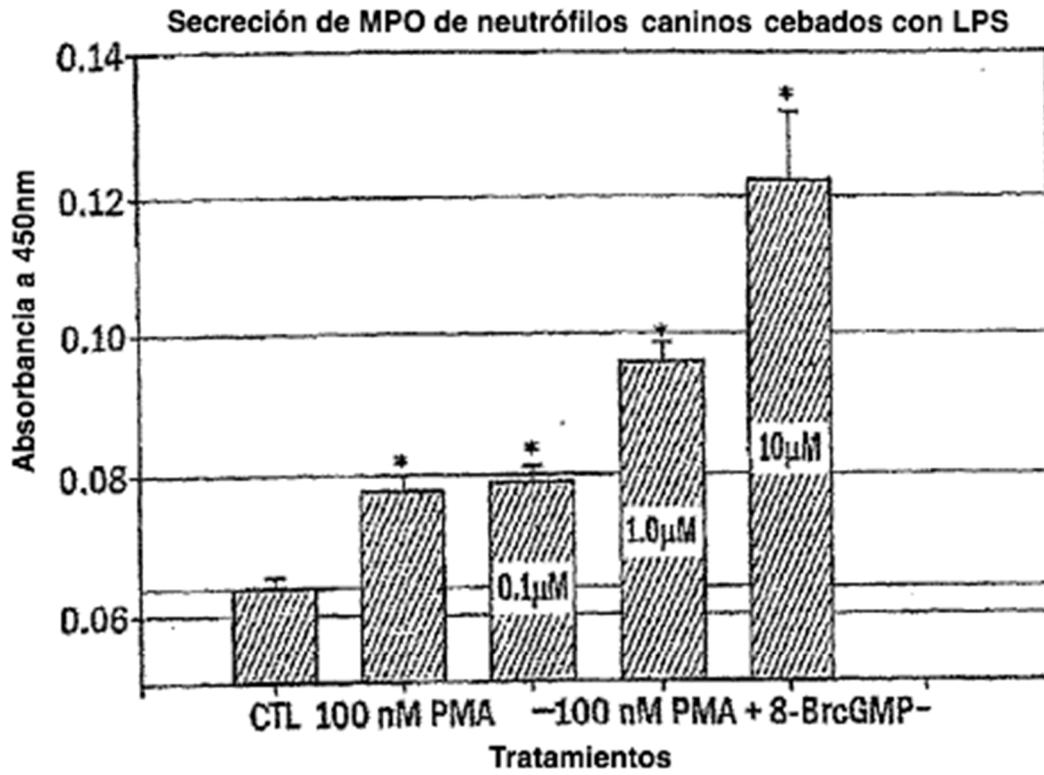


FIG. 10

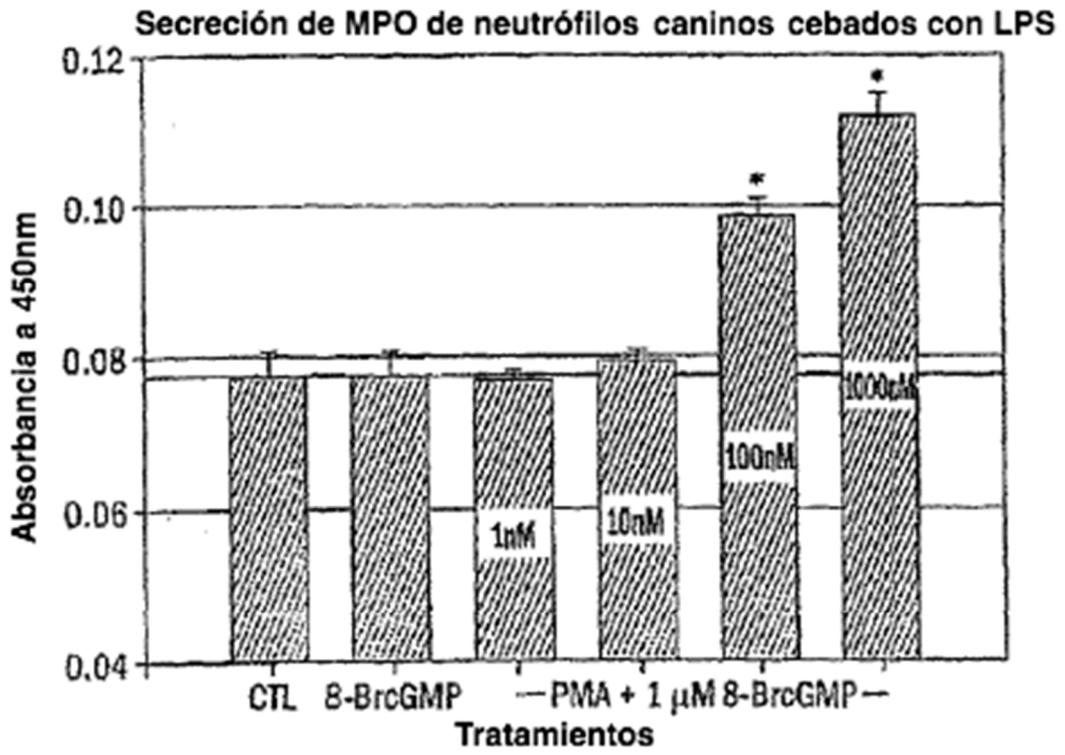


FIG. 11

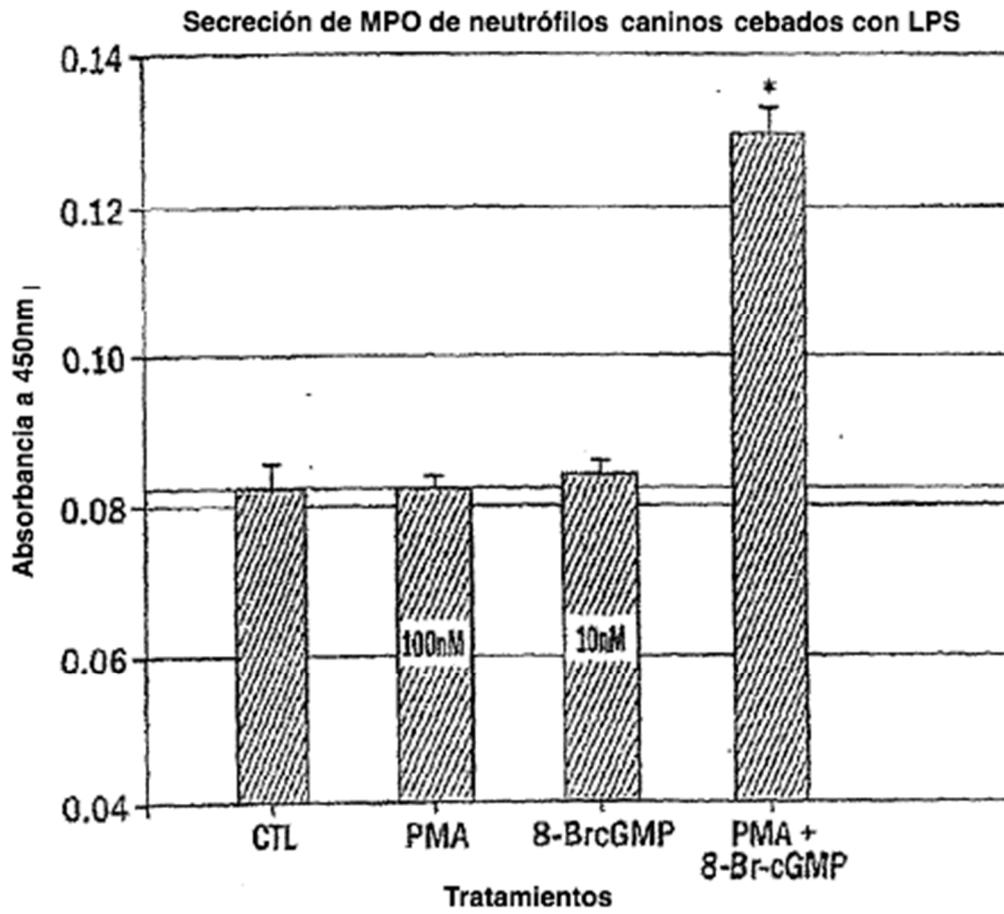


FIG. 12